

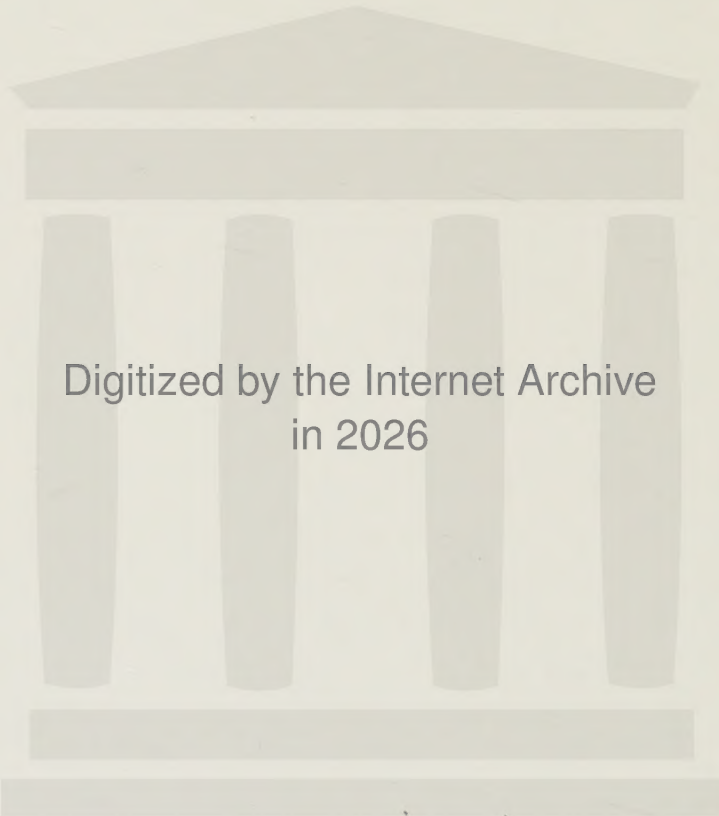
Aus dem Institut für Obstbau
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. W. Gruppe

**Untersuchungen zur in-vitro-Kultur
von Embryonen und Embryoachsen der Kirsche
(Pr. avium u. a.)**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Diplomlandwirt Abdelmonem Abou-Zeid
aus El-Gharbia/Ägypten

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545915_0001

Aus dem Institut für Obstbau
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. W. Gruppe

**Untersuchungen zur in-vitro-Kultur
von Embryonen und Embryoachsen der Kirsche
(Pr. avium u. a.)**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Diplomlandwirt Abdelmonem Abou-Zeid
aus El-Gharbia/Ägypten

Gießen 1970



Dekan: Prof. Dr. R. Waßmuth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gruppe

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. H. Neumann

Nebenfach: Botanik (Priv. Doz. Dr. J. F. Neubauer)

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 1970

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literaturübersicht	5
3. Material und Methoden	19
4. Versuche mit unreifen Embryonen und Embryoachsen unter Varrierung verschiedener Faktoren (1967)	33
4.1 Versuche mit unreifen Embryonen auf Agarmedien	33
4.2 Versuche mit Embryoachsen von unreifen Kirschembryonen	44
5. Versuche mit unreifen Embryonen und Embryoachsen in flüssiger Nährlösung und verschiedener Weiterkultur (1968)	47
5.1 In flüssiger Nährlösung nach Auxophytonmethode	47
5.2. Varrierung von Hormonen und Vitaminen in der Nährlösung	54
5.3 Umsetzen auf Agarnährmedien und in Einheitserde unter verschiedenen Kulturbedingungen	56
6. Wirkung von Kotyledonenreduktion und von nativen "Extrakte" auf das Wachstum ausgereifter ruhender Kirschembryonen (1968/69)	59
6.1 Die Wirkung gradueller Kotyledonenreduktion	60
6.2 Die Wirkung von Extrakten aus nachgereiften Embryonen	61
6.3 Vergleich von Embryoachsen normal ausgebildeter und geschrumpfter Embryonen	68
7. Wirkung von Äthanolextraktzugabe und Kotyledonenreduktion auf das Wachstum unreifer Kirschembryonen (1969)	70
8. Diskussion	77
9. Zusammenfassung	85
10. Literaturverzeichnis	88

Beachte: Sämtliche Abbildungen sind aus drucktechnischen Gründen um 30% verkleinert worden.

1. Einleitung und Problemstellung

Bei den Steinobstarten treten in zahlreichen Fällen nach regulärer Befruchtung und anscheinend normaler Anfangsentwicklung Störungen in der Weiterentwicklung der Embryonen auf, die bei Züchtungsarbeiten große Nachteile mit sich bringen.

Bei Frühsorten der Kirschen kommt es - infolge einer sehr kurzen zweiten Phase der Fruchtentwicklung - sehr oft zu einer Wachstumsstörung mit anschließendem Abortieren des Embryos; auch bei mittelspäten und späten Sorten sind Resorptionsercheinungen der Reservesubstanzen der embryonalen Gewebe, die mit Schrumpfungen des Embryos verbunden sind, recht häufig beobachtet worden. Es kommt in diesen Fällen meistens zu einem Absterben der Embryonen während der Fruchtentwicklung am Baum oder nach der Ernte bzw. während der Samenlagerung und Nachreife.

Werden solche Embryonen rechtzeitig - vor Einsetzen der Schädigung - isoliert und unter künstlichen Bedingungen (sog. Embryokultur) aufgezogen, lassen sich aus ihnen in vielen Fällen noch lebensfähige Pflanzen entwickeln (TUKEY 1933c, s. Literaturübersicht).

Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß weniger als 50 % der Embryonen zu Jungpflanzen auswachsen. Viele der auf diese Weise herangezogenen Sämlinge zeigen in der späteren Entwicklung Zwergwuchs und/oder Blattdeformationen, die mit weiteren Ausfällen verbunden sind.

Durch eine Kältebehandlung bei Temperaturen über Null Grad Celsius konnte ein günstiger Einfluß auf das Wachstum solcher in-vitro kultivierter Steinobstembryonen - mit Ausnahme der Aprikose - erzielt werden (ZAGAJA, 1962 b u. 64).

Da diese Kältebehandlung jedoch normalerweise erst im Herbst beendet ist, wenn die Außenbedingungen für das Weiterwachsen der Sämlinge sehr ungünstig sind, lassen sich derart behandelte Pflanzen nur mit erheblichem Aufwand im Gewächshaus unter optimalen Licht- und Wärmeverhältnissen weiterkultivieren (ZAGAJA, 1964).

Im Institut für Obstbau der Justus Liebig-Universität Gießen werden Arbeiten durchgeführt mit dem Ziel, Kirschenunterlagen zu entwickeln, die das Wachstum der darauf veredelten Süßkirschsornten reduzieren sollen (GRUPPE 1969).

Von einigen schwachwachsenden, buschartigen Wildarten der Kirsche ist bekannt, daß sie als Unterlage die Wuchskraft der Sorte stark einschränken. Häufig treten bei diesen Arten jedoch Unverträglichkeitserscheinungen mit den Kultursorten auf (GARNER 1968).

Das Züchtungsprogramm in Gießen (SCHMIDT, 1970) basiert auf Kreuzungen zwischen solchen Wildarten mit Sorten und Formen von *Prunus avium*, die bisher die beste Verträglichkeit mit allen Süßkirschsornten gezeigt haben.

Bei der Erzeugung dieser Bastarde war damit zu rechnen, daß u.a. auch erhebliche Störungen bei der Embryoentwicklung auftreten, weil z.B. die Eltern in ihren Früchten extreme Reifezeiten und Reifephasenlängen aufwiesen.

Um die Ausbeute an lebensfähigen Bastarden möglichst groß zu halten, wurde ab 1967 mit systematischen Untersuchungen über die "in-vitro-Kultur" von Kirschembryonen begonnen. Das Hauptziel war primär eine möglichst rationelle Methode zu entwickeln, um einen hohen Prozentsatz lebensfähiger Pflanzen zu erhalten, aber auch die Möglichkeit zu prüfen, den Anzuchtzyklus der Sämlinge zu verkürzen.

Die 1967 durchgeführten Versuche (Teil 4) befaßten sich vorwiegend mit der Anwendung bisher bekannter Methoden und Techniken. Hierbei wurden verschiedene Süßkirschsornten und in geringem Umfange auch Sauerkirschen und Pr. Mahaleb einbezogen; die Embryonen wurden ab etwa 36 - 38 Tage nach Vollblüte in Abständen entnommen. Es wurden verschiedene Nährlösungen erprobt. Neben einer Kultur auf Agarmedium, die bisher vorwiegend angewandt worden ist, wurde auch die Kultur in flüssiger Lösung nach der Auxophyton-Methode einbezogen. Ebenso erfolgte die Einbeziehung einer Kältebehandlung der Embryonen. Erste Versuche, die sich mit der Kultur von Embryoachsen befaßten, zeigten ein gegenüber der Agarkultur außerordentlich vorteilhaftes Wachstum der Sprosse, jedoch keine Wurzel-

bildung. Da die Embryoachsen auch bei geschrumpftem Embryo nicht vom Resorptionsprozeß betroffen werden, wurde in den folgenden Jahren der Kultur der Embryoachsen besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Die im Jahre 1968 durchgeführten Untersuchungen (Teil 5) basierten auf den Ergebnissen der im Vorjahr erzielten Ergebnisse und befaßten sich mit zwei unklaren Problemkomplexen: einmal der Frage der zeitlichen Ausbildung der Embryoruhe oder Embryo-Dormanz während der Entwicklung der Früchte am Baum. Zum anderen wurden Versuche zur Förderung der Wurzelbildung bei Embryonen und Embryoachsen durchgeführt, die in flüssiger Nährlösung nach der Auxophytonmethode - im Vergleich mit Kultur auf dem Agarmedium - zwar eine sehr gute Sproßentwicklung, aber keine Wurzelbildung zeigten. Die hierbei erzielten Ergebnisse ließen vermuten, daß in den Kotyledonen ein Wurzelbildungsfaktor vorliegt, bzw. ein Förderungs-Hemmmechanismus wirksam ist.

Da die Untersuchungen und Versuche während der Reifezeit der Kirschen - aus technischen Gründen - in ihrem Umfang begrenzt sind, wurden im Winter 1968/69 (Teil 6) Versuche mit reifen (d.h. nach der Frucht reife entnommenen), aber nicht-nachgereiften (d.h. nicht stratifizierten, sich in Samenruhe befindlichen) *Pr. avium* Embryonen durchgeführt. Hierbei wurden die Kotyledonen graduell entfernt (Teil 6.1), die Wirkung einer Zugabe verschiedener nativer Extrakte aus stratifizierten (nachgereiften) Kirschembryonen (Teil 6.2) und ein Wachstumsvergleich zwischen Embryoachsen aus geschrumpften bzw. normal ausgewachsenen Embryonen (Teil 6.3) untersucht. Durch Zugabe von Äthanolextrakten (entsprechend 1 Embryo/Embryoachse) konnten rund 80 % der kultivierten Embryoachsen zu Jungpflanzen entwickelt werden.

Die Anwendung dieser Methode, d. h. vollständige Kotyledonenreduktion und Zugabe von nativen Äthanolextrakten aus nachge-

reiften Kirschsamen, zu unreifen ab 46 Tagen nach Vollblüte entnommenen Embryonen ergab im Jahr 1969 (Teil 7) einen vergleichsweise sehr hohen Prozentsatz normalwachsender Pflanzen bei der Sorte Rotterts Braune und bei der Kreuzung Schattenmorelle x Kassins Frühe.

2. Literaturübersicht

Schon seit langem werden bei Kirschen embryologische Untersuchungen durchgeführt. MALPIGHI (1675) gibt einen einfachen Überblick über die Samenentwicklung bei der Mandel und fügt hinzu, daß die Entwicklung bei der Kirsche ähnlich verläuft. Über die Differenzierung der Samenanlagen bei Süßkirschen schreiben PÉCHOUTRE (1902) und RÜHLE (1924). TILLSON (1947) führte Untersuchungen über die Differenzierung der Blüte und Embryoentwicklung bei Prunus mahaleb durch. LINDENBEIN (1963) gibt eine ausführliche Beschreibung der im Samenhandel befindlichen Steinkerne der Gattung Prunus. MAURER (1969) berichtet über die Blüte und die Befruchtungsverhältnisse bei Süß- und Sauerkirschen. Über das embryonale Wachstum in der späteren Entwicklung bei Kirschen geben TUKEY (1933b), SCHANDERL (1949) und STÖSSER (1966) Auskunft. TUKEY (l.o.), LILLELAND und NEWSAME (1934) und STÖSSER (l.o.) erläutern das Wachstum der Süßkirsch-Frucht. Ähnlich schreiben TUKEY (1934a), TUKEY und YOUNG (1939) und MURAWSKI und ENDLICH (1962) in ihren Untersuchungen über die Fruchtentwicklung bei Sauerkirschen und CONNORS (1919), BLAKE (1925), LILLELAND (1932) und TUKEY (1933a) bei Pfirsich. KRAMER (1956) führte bei 10 verschiedenen Pfirsichsorten, die eine unterschiedliche Reifezeit haben, Untersuchungen über Embryonal- und Fruchtentwicklung durch. LILLELAND (1931) berichtet über die Fruchtentwicklung bei Aprikosen sowie über den Einfluß der Temperatur auf diese (1935), TUKEY (1940) berichtet über die Dauer der Fruchtentwicklung von Vollblüte bis Frucht reife bei verschiedenen Sorten von Apfel, Birne, Pfirsich und Kirsche. Über die Fruchtentwicklung bei Mandeln schreibt SARFATTI (1961), bei Pflaumen LILLELAND (1933) und STERLING (1953).

Übereinstimmend berichten die oben genannten Autoren über den Verlauf des Fruchtwachstums bei Steinobst in drei Phasen. Die erste Phase bringt ein starkes Wachstum der Frucht, die zweite ein verlangsamtes oder völlig eingestelltes Wachstum, dagegen eine starke Entwicklung des Embryos. Die dritte Phase zeichnet sich durch erneutes rasches Fruchtwachstum bis zur

Fruchtreife aus. Die graphische Darstellung dieses Wachstumsverlaufes ergibt eine doppelte S-Kurve.

Mehrere Autoren untersuchten den Einfluß der Umweltfaktoren auf die Fruchtentwicklung bei Obstbäumen. Über den Einfluß der Standortverhältnisse auf die verschiedenen Phasen der Fruchtentwicklung berichten LILLELAND und NEWSAME (1934), BRAAK (1962) und STÖSSER (1966 und 68) bei Süßkirschen; L.D. TUKEY (1952) bei Sauerkirschen; LILLELAND (1935) bei Aprikose. CRANE und PUNSRI (1956) sowie BRADLEY und CRANE (1957) untersuchten durch Spritzung von fruchtenden Aprikosenbäumen die Auxinwirkung auf die Entwicklung der Samen. WILLING (1960) berichtet in seinen phänologischen und chemischen Untersuchungen der Fruchtentwicklung bei Kirschen über den Einfluß der Unterlagen auf den Blühverlauf und das Fruchtwachstum sowie auf die chemische Zusammensetzung des Fruchtfleisches.

Zahlreiche Autoren berichten über die Beziehung zwischen Hormonproduktion der Samen und der Fruchtentwicklung. MÜLLER-THURGAU (1898) fand bei der Weinrebe, daß eine positive Korrelation zwischen Fruchtgewicht und Zahl der Samen besteht. Ähnliches wurde später von anderen Autoren bei Kernobst gefunden (Literatur bei KOBEL 1954). HEINICKE (1917) stellte bei Äpfeln fest, daß die Neigung zum Fruchtfall desto geringer ist, je mehr gut ausgebildeten Samen die Früchte enthalten. LUCKWILL (1948 u. 53) fand, daß Fruchtwachstumsperioden mit sehr aktiver Hormonproduktion oft mit niedrigem Fruchtfall verbunden sind.

Die Bedeutung der Embryokultur besteht in der Verkürzung des Anzuchtzyklus und der Überwindung der Ruheperiode von dormanten Samen, LAMMERTS (1942) bei Steinobst und RANDOLPH (1945) bei Iris. Außerdem bietet die Methode der Embryokultur die einzige Möglichkeit aus Embryonen, die unter ihren natürlichen Wachstumsbedingungen abortieren, nach der Isolation lebensfähige Pflanzen zu entwickeln. TUKEY (1933c, 38), LESLEY und BONNER (1952), NEUMANN (1969d). Das Phänomen der Abortion

der Embryonen wurde von MÜNTZING (1930/31) beschrieben und später vielfach erwähnt (BRADBURY 1929, WATKINS 1932, TUKEY 1933b, 1934a, 1936, 1937, v.WANGENHEIM 1961 und 62, STÖSSER 1966, 67, SKIEBE 1967).

Die Bemühungen, pflanzliche Teile in vitro zu kultivieren, lassen sich bis in das 18. Jahrhundert zurückverfolgen (Literatur bei STINGL 1907). Bei der Arbeit von HANNIG (1904) konnte mit einiger Berechtigung von einer Embryokultur gesprochen werden. Er kultivierte unter anderem Embryonen von Raphanus in verschiedenen Kulturmedien, die Zucker, Mineralsalze, Aminosäuren und Pflanzenextrakte enthielten. DIETRICH (1924) wiederholte diese Versuche und weitete sie aus, um Arten von anderen Familien einzuschließen. LAIBACH (1925, 30) zeigte die Vorteile der Embryokultur, indem er erfolgreich Embryonen von Leinhybriden in vitro weiterentwickelte, die gewöhnlich unter ihren natürlichen Bedingungen abortieren.

Hier sollen einige Embryokulturversuche bei Stein- und Kern-obst genannt werden:

Süßkirschen: TUKEY (1933c), DANIELSSON (1950), BRAAK (1957), ZAGAJA (1961a, 61b und 64), KRAPF und THEILER (1968), ZDRUIKOVSKAJA (1951, 53);

Sauerkirschen: TUKEY (1935, 38), ZAGAJA (1964);

Pfirsich: DAVIDSON (1933, 35), TUKEY (1935, 38), BLAKE (1939), SKIRM (1942), LAMMERTS (1943), LESLEY und BONNER (1952), KESTER und HESSE (1955), ZAGAJA (1962b, 64), MONET (1968);

Aprikosen: LAMMERTS (1942), ZAGAJA (1962b, 64);

Pflaumen: TUKEY (1935), ZAGAJA (1964);

Birnen: TUKEY (1935, 38);

Apfel: TUKEY (1935, 38), ZAGAJA (1962a).

NARAYANASWAMI und NORSTOG (1964) geben in ihrer Arbeit über die pflanzliche Embryokultur in einer Aufstellung, die nach

verschiedenen Pflanzenfamilien bzw. Gattungen gegliedert ist, genaue Auskunft über Autoren, die sich mit der Embryokultur befaßten. Der Begriff "Embryokultur" wird in der Literatur in unterschiedlichem Sinne gebraucht. Gewöhnlich wird er verwendet, um die Wachstumsprozesse von Embryonen in verschiedenen Kulturmedien zu beschreiben. Alter, Größe und das Entwicklungsstadium des Embryos werden meist außeracht gelassen. Nach RIJVEN (1952) sollte zwischen Kulturen unterschieden werden, bei denen die Embryonen vor oder nach der Reife der Samen entnommen werden.

Für die künstliche Aufzucht pflanzlicher Embryonen spielt die Zusammensetzung der Nährlösung die bedeutendste Rolle (NEUMANN 1969a). Rezeptzusammenstellungen verschiedener Nährlösungen sind bei TUKEY (1938), WHITE (1943), RANDOLPH (1945), NITSCH (1951), GAUTHERET (1959), MURASHIGE und SKOOG (1962) zu finden. Nach RAGHAVAN (1966) soll die Kultur pflanzlicher Embryonen unter zwei ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten betrachtet werden. Endgültig differenzierte und reife Embryonen benötigen für die Kultivierung ein einfaches Medium. Proembryonen bzw. sehr junge Embryonen brauchen in vitro zusätzliche Nähr- und Wachstumsstoffe wie Aminosäuren, Endospermextrakt u.a.

Einige Versuche mit dem Ziel, die Befruchtungsvorgänge in vitro ablaufen zu lassen und die Kultur schon mit den Zygoten zu beginnen, wurden mit Erfolg durchgeführt (MAHESHWARI 1958, DULIEU, 1966). Daher wird die Bedeutung der Embryokultur in Zukunft weiter zunehmen (KLASSEN und LARTER 1967).

Allgemein gibt es die Kulturmethode in flüssiger Nährlösung und auf festen Agarmedien. Von VEH (1936a, 36b) kultivierte freipräparierte Embryonen auf feuchtem Filterpapier und feuchtem Sand, TUKEY (1936) und TAYLOR (1957) in steriler Erde. Hier handelt es sich nicht um Embryokultur im eigentlichen Sinne.

CAPLIN und STEWARD (1949) berichten über die Verwendung von flüssiger Nährlösung, daß durch Schütteln der Kulturgefäße die Anreicherung mit Sauerstoff gefördert wird. STOKES (1925a) setzte die Embryonen auf zwei Streifen Filterpapier, deren Enden im Reagenzglas in flüssige Nährlösung eintauchten: dadurch befand sich der Embryo an der Luft und bekam die Nährlösung über die Papierstreifen zugeführt. Über die Kultur von sehr jungen Embryonen in hängenden Tropfen für Beobachtungszwecke berichtet TUKEY (1938). Zur Festigung der Nährlösung wird im allgemeinen Agar verwendet (TUKEY 1933c, 38, WERCKMEISTER 1934, 36, NEUMANN 1969a.u.a.). Für die Agarkonzentration wird oft 0,6 - 1 % angegeben (BRAAK 1957, HALL 1948, KRAPP und THEILER 1968). DIETRICH (1924) beobachtete in seinen Untersuchungen, daß bei einem Agarzusatz von mehr als 1,5 % das Embryowachstum gestört wird. WERCKMEISTER (1934) isolierte Irisembryonen aus reifen Samen und brachte sie zur weiteren Entwicklung auf Medien mit 5 bzw. 10 % Agar. Dadurch konnten die Quellungsvorgänge verlangsamt und somit das Zerreißen der Gewebe umgangen werden.

Die günstigste Zuckerkonzentration im Kulturmedium hängt nicht allein von dem Reifegrad der Embryonen ab, sondern auch von der Pflanzenart (NARAYANASWAMI und NORSTOG 1964). PARIS et al. (1953) berichten, daß die optimale Zuckerkonzentration für das Wachstum sehr junger Datura-Embryonen (kleiner als 0,3 mm) 8 % ist. Für größere, bzw. reife Embryonen ist eine niedrigere Konzentration geeigneter. Eine ähnliche Beziehung zwischen dem Reifegrad des Embryos und der günstigen Wirkung der Zuckerkonzentration fanden TUKEY (1938) und BRAAK (1957) bei Kirschembryonen. Sie berichten, daß unreife Embryonen für das weitere Wachstum eine relativ hohe Zuckerkonzentration (2 %) benötigen, dagegen die ausgereiften Embryonen besser bei niedriger Konzentration (0,5 %) oder ohne Zuckerzugabe in vitro wachsen. Van OVERBEEK et al. (1944) stellten fest, daß Saccharose besser als andere Zuckerarten für das Wachstum der Datura-Embryonen geeignet ist. Ähnlich berichtet LOFLAND (1950) bei Baumwoll-Embryonen und RIJVEN (1952) bei Capsella-Embryonen

BALL (1959) erkannte, daß Saccharose, Glukose, Lävulose und Raffinose für das Wachstum von Gingko-Embryonen eine gewisse Aktivität besitzen.

In den meisten Embryokulturen wird ein pH-Wert von 5 - 7 angegeben (RAGHAVAN 1966). BRAAK (l.c.) fand, daß der pH-Wert des Mediums zwischen 5 - 7 bei der Kultur von Kirschembryonen wenig oder keinen Einfluß auf das Wachstum des Embryos hatte. CHOUDHURY (1955) untersuchte den Bereich des pH-Wertes von 4,5 - 8,5 bei in vitro kultivierten Tomaten-Embryonen und gibt den optimalen pH-Wert für das Wachstum mit 6,5 an. MATSUBARA (1962) berichtet, daß in vitro kultivierte Datura-Embryonen im Bereich der pH-Werte 5,0 und 8,1 gut wachsen; bei pH-Werten unter 4,4 wurde das Wachstum inhibiert.

Im allgemeinen wachsen die jungen Embryonen in vitro besser bei einem hohen osmotischen Druck als reife Embryonen (ZIEBUR und BRINK 1951). Dies wurde auch von RIETSEMA et al. (1953) bei Datura-Embryonen und von VEEN (1963) bei Capsella-Embryonen beobachtet.

Mehrere Autoren erwähnen den Zusatz von natürlichen Extrakten zur Nährlösung. Van OVERBEEK et. al. (1941) stellten durch Zugabe von Kokosaußmilch eine stimulierende Wachstumswirkung der in vitro kultivierten, sehr jungen Datura-Embryonen fest. Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Verwendung von Kokosnußmilch geben z.B. HALL (1948), ZIEBUR und BRINK (1951) und SMITH (1967). INOMATA (1968) erwähnt den Einsatz von Tomatensaft in der Embryokultur. MATSUBARA (1962 u. 64) arbeitete erfolgreich mit einem Diffusat aus Lupinen. Van OVERBEEK et al. (1944) untersuchten den Einfluß der Zugabe von Hefeextrakten, Weizenkeimen u.a. auf das Wachstum von Datura-Embryonen in vitro. Über die Lichtverhältnisse der in vitro-Kulturen berichtet GORTER (1955), daß junge Embryonen bei Licht- und Dunkelheit gleich gut wachsen. HANNIG (1904) und RANDOLPH (1945) erwähnen, daß bei ausgewachsenen bzw. reifen Embryonen das

Wachstum durch Licht stimuliert wird. Für eine Kultivierung der Embryonen von Prunus ist Licht unbedingt erforderlich (TUKEY 1933c).

Die Temperaturansprüche der Embryokultur sind je nach Pflanzenart unterschiedlich; generell wachsen die Embryonen der meisten Pflanzen gut bei $25 - 30^{\circ} \text{C}$ (VARAYANASWAMI und NORSTOG 1964). TUKEY (1938) gibt eine Temperatur von 18°C für die Embryokultur bei einigen Stein- und Kernobstarten an; TAYLOR (1957) gibt für die Kulturen von Pfirsichembryonen eine Temperatur von über 15°C an, MONET (1968) für sehr junge Pfirsichembryonen 27°C .

Einige Autoren berichten bei in-vitro-Kulturen über eine Vorbehandlung mit niedriger Temperatur, die die embryonale Dormanz brechen und zugleich das Embryowachstum anregen soll. LESLEY und BONNER (1952) förderten das Wachstum unreifer Pfirsichembryonen in vitro nach dem sie die Früchte 7 Wochen bei 2°C lagerten. HESSE und KESTER (1955) wiederholten dies bei Kirschen, Mandeln und Pflaumen. BROOKS und HOUGH (1958), THEOBALD und HOUGH (1960) und ZAGAJA, HOUGH und BAILEY (1960) führten eine Stratifikation bei in-vitro-Kulturen von Pfirsich durch, ZAGAJA (1959, 61b, 62b und 64) bei einigen Stein- und Kernobstarten. Sie berichten alle, daß die Kältebehandlung einen günstigen Einfluß auf das Wachstum des Embryos zeigte.

Die allgemeinen Methoden der Sterilisation sind aus der mikrobiologischen Praxis bekannt (KRUEGER 1953, WALLHÄUSER und SCHMIDT 1967). Spezielles über die Technik und Arbeitsmethoden bei Stein- und Kernobst sind bei TUKEY (1933c, 35, 38), GILMORE (1950), BROOKS und HOUGH (1958), FLEMION und PROBER (1960), MONET (1968) sowie bei anderen zu finden.

Die Desinfektion des Arbeitsraumes kann durch Besprühen mit Formalinlösung bzw. Triäthylenglykol erfolgen (NEUMANN 1969a). Die einfachste Methode ist die Luftsterilisation

mit Hilfe von UV-Strahlen (TANNER 1953, DRESSLER 1955, NEUMANN 1969a).

Für die Sterilisation der Embryonalgewebe wurde Kalzium bzw. Natriumhypochloritlösung von WILSON (1915) bzw. RANDOLPH und COX (1943) verwendet; Quecksilber (II) und Alkohol von SANDER und ZIEBUR (1963), Brom von LA RUE (1937). GILMORE (1950) hält 0,05 % Merthiolat (Handelspräparat) in 50%-igem Alkohol für das beste Desinfektionsmittel. Kalziumpermanganat und Wasserstoffsuperoxyd wurden zu Sterilisation von Brassica-Schoten von NEUMANN (1969a) angewendet.

Form und Art des Materials der Kulturgefäße wird bei WHITE (1943) diskutiert. STEWARD et al. (1952) verwendeten bei der von ihnen entwickelten Auxophytonmethode für die flüssige Nährlösung spezielle Kulturgefäße.

Die Sterilisation der Kulturgefäße erfolgt in der Regel im Autoklaven bei einem Druck von 1 - 2 atü für 15 - 30 Minuten (TUKEY 1933c, KEIM 1953, FLEMION und PROBER 1960). Für die besonders hitzelabilen Substanzen in der Nährlösung ist die Filtersterilisation vorteilhafter (NEUMANN 1969a). Über die Bedeutung der Lage des Embryos auf bzw. in dem Nährmedium ist Literatur bei SANDER und ZIEBUR (1963) zu finden.

Weiter wird über Keimphysiologie, Wachstum, Keimung und die weitere Entwicklung der Sämlinge berichtet.

Über die Keimphysiologie der Samen berichtete HILDEBRANDT (1959) in seinen Untersuchungen über die Ursache der Keimruhe bei Steinobstsaatgut und gibt eine Kombination von Schalenwirkung und innerer Embryo-Dormanz als Ursache der Keimruhe an. Er fügt hinzu, daß die Überwindung der Keimruhe durch Stratifikation bei niedrigen, konstanten Temperaturen die brauchbarste Vorbehandlungsmethode ist. HILDEBRANDT (1960a) untersuchte die Feuchtigkeitsaufnahme des Steinobstsaaftgutes bei der Quellung und den Einfluß der Feuchtigkeit

auf die Keimung und stellte fest, daß Stein- und Samenschale die Wasseraufnahme stark hemmten. Er ermittelte (1960b) die Mindeststratifikationsdauer bei verschiedenen Steinobstarten und gibt z.B. für *Prunus mahaleb* 10 - 12, *Prunus avium* 15 - 16, Kulturkirschen 16 - 18 und Pfirsich 14 - 16 Wochen an. ZIELINSKI (1958) förderte das Wachstum frühreifender Süßkirschsamens durch Entfernen der Stein- schale und Behandlung der Kerne in feuchtem "Sphagnum" bei Wechseltemperaturen von 2,5 - 5° C über 120 Tage. PILLAY, BRASE und EDGERTON (1965) und PILLAY und EDGERTON (1965) fanden, daß die Behandlung der Kirschsamens mit Gibberellinsäure die Samenkeimung anregt, die Nachreifezeit verkürzt und zum Teil ersetzt. MES (1959) berichtet bei Pfirsich dagegen, daß die GA-Behandlung nur den Widerstand der Samenschale gegen die Keimruhe zu brechen hilft. Sie hat aber nicht die spezifische Wirkung der Stratifikation auf das weitere Wachstum des Sprosses und kann deshalb die Nachreife nicht ersetzen.

SUSZKA (1962 und 67) und JOLEY (1967) berichten über den Einfluß der Stratifikationstemperatur auf die Überwindung der Keimruhe bei Samen von *Prunus avium*. Sie fanden, daß eine warme, feuchte Behandlung des Saatgutes vor der Stratifikation mit niedriger Temperatur einen günstigen Einfluß auf die Keimung ausübt. CARLSON (1967) erkannte, daß eine Feldstratifikation für die Keimung der Pfirsichsamens besser als eine kontrollierte ist. Stratifikation bei 70° F war günstiger als bei 32° F. LUTKOVA und OLESHKO (1965) durchströmten Kirschsamens während der Stratifikation mit einem elektrischen Strom von 0,57 mA/cm², hierdurch wurde die Stratifikationsdauer verkürzt. Die Beschleunigung der Samenkeimung steht in direkter Beziehung zur Erhöhung der Aktivität der Katalase und einem verstärkten Verbrauch der Reservestoffe durch Intensivierung der Oxydations-Reduktions-Prozesse. CHAO und WALKER (1967) konnten bei nicht-nachgereiften Samen von Aprikosen und Äpfeln durch die Wirkung eines Elektromagneten die Keimung beschleunigen und den Keimprozentatz erheblich erhöhen. Bei Pfirsich dagegen war die Wirkung negativ.

Weitere Untersuchungen über die Keimphysiologie bei Steinobst sind zu finden bei: CROCKER und BARTON (1931 und 53), HAUT (1934), HILKENBÄUMER (1936), von VEH (1936a, 36b und 37), RÉMY (1952 und 57), HESSE und KESTER (1955), PASSECKER (1955), FOGLE (1958) und FOGLE und Mc CRORY (1960).

bei Kernobst: CROCKER und BARTON (l.c.), de HAAS und SCHANDER (1952), PASSECKER (l.c.), SCHANDER (1955a, 55b, 56a, 56b) und FRANKLAND (1961).

Die Beziehung zwischen Kotyledonen und dem weiteren Wachstum des Embryos ist von mehreren Autoren untersucht worden. KESTER (1953) stellte in seinen Untersuchungen fest, daß bei Pfirsichembryonen die Entkotyledonisierung das weitere Wachstum der Embryoachse in vitro hemmt. FLEMION und PROBER (1960) entwickelten dagegen von solchen Embryoachsen normale Pfirsichsämlinge. HOTTA (1957) fand, daß eine teilweise Entfernung der Kotyledonen bei *Vigna sesquipedalis* eine Wachstumsabnahme verursachte. BROWN und GIFFORD (1958) berichten über die Bedeutung der Kotyledonen für die Entwicklung der Kiefernwurzel und schreiben, daß das Wachstum nur angeregt wird, wenn die Nährlösung den Embryonen durch die Kotyledonen zugeführt wird. Dies fand BALL (1959) ebenfalls bei reifen Embryonen von *Ginkgo biloba*. BERLYN und MIKSCHÉ (1965) erkannten, daß Pinus-Embryonen nach Entfernung der Kotyledonen in vitro weiterwachsen können. CHAILAKHIAN und PODOLNY (1968) nehmen an, daß die Kotyledonen bei *Xanthium* und *Pisum* Stoffe enthalten, die auf die spätere Blühinduktion hemmend wirken. SASAKI und KOZLOWSKI (1968) berichten über die wichtige Rolle der Kotyledonen für die Frühentwicklung der Sämlinge bei Kiefern. Sie untersuchten die Einzelheiten und das Ausmaß der CO_2 -Assimilation der grünen Kotyledonen.

Über die biologische Bedeutung der Samenruhe berichtet POPTSOV (1966), daß durch die Verhinderung einer vorzeitigen Keimung den Pflanzen ein sicheres Gedeihen in günstigeren

Witterungsverhältnissen ermöglicht wird. Bei der Züchtung ist es in bestimmten Fällen notwendig, die Keimruhe zu brechen, um eine Verkürzung des Anzuchtszyklus zu erreichen oder der Abortion der Embryonen zuvorzukommen (LAMMERTS 1942, TUKEY 1933c).

Eine gründliche und umfangreiche Zusammenfassung über die Erkenntnisse der Keimruhe und ihre Richtwege, auf denen das Geschehen verläuft oder verlaufen könnte, gibt AMEN (1968). Er berichtet, daß die Keimruhe als eine Wachstums-einstellung zu betrachten ist und daß es offenbar einen allgemeinen Regulationsmechanismus gibt. Es handelt sich um ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Regulatoren, das bald zur Seite der fördernden, bald zur Seite der hemmenden verschoben werden kann.

MER (1968) versucht, um Mißverständnisse zu vermeiden, den Begriff "Hemmstoff" zu definieren. Der Autor schlägt vor, nicht von Hemmstoffen bzw. einer Hemmung (Inhibition) sondern neutral von Aufhebung (Nullifikation, Elimination) des fördernden Einflusses des zugesetzten Wuchsstoffes zu sprechen.

Mehrere Autoren versuchten durch biochemische Untersuchungen während der Fruchtentwicklung bzw. der Samennachreife den Prozeß der Keimruhe und Nachreife aufzuklären.

MIMAUULT (1957) untersuchte den Wuchs- und Hemmstoffgehalt der Kirschsamen während der Fruchtentwicklung am Baum. Er fand, daß der Samenextrakt zwei saure und zwei neutrale Wuchsstoffe enthält. Während der Frucht reife ändert sich der Gehalt der verschiedenen Wuchsstoffe, von denen nur einer als IES identifiziert werden konnte.

POLLOCK und OLNEY (1959) verfolgten Wachstum, Translokation und Atmungswechsel in den Embryonalorganen nachreifender Kirschsamen von *Prunus cerasus*. Wenig später berichteten OLNEY und POLLOCK (1960) in ihren Untersuchungen über die Ver-

schiebungen im Stickstoff- und Phosphatgehalt embryonaler Organe nachgereifter Kirschsaamen.

LA CROIX und JASWAL (1967) vertreten die Ansicht, daß die bei ihren Untersuchungen auffällige Erhöhung der Respirationsrate bei Embryoachsen von 7 Wochen nachgereiften Samen von *Prunus cerasus* auf eine vermehrte Aktivität des Pentosephosphat-Zyklus zurückzuführen sei.

PROCTOR und DENNIS (1968) versuchten Gibberellinsäure-ähnliche Substanzen quantitativ und qualitativ bei Samen von *Prunus avium* zu bestimmen, um einen möglichen Zusammenhang mit der Ruheperiode zu finden. Aus den Versuchsergebnissen konnten die Autoren wegen der stark unterschiedlichen Reaktion der in einem biologischen Test geprüften Substanzen keine gesicherte Schlußfolgerungen ziehen.

PIENIAZEK und GROCHOWSKA (1967) berichten über die Rolle eines natürlichen Hemmstoffes (Abscisin II) bei der Keimung von Apfelsamen und die Veränderungen im Gehalt phenolischer Substanzen während der Stratifikation.

LUCKWILL (1952) stellte in seinen Untersuchungen über wachstumshemmende und wachstumsfördernde Substanzen sowie deren Beziehung zur Ruhe und Nachreife bei Apfelsamen fest, daß während der Nachreife wachstumsfördernde Substanzen auftreten. Die Substanzen sind nach entsprechender Trockenlagerung nicht feststellbar.

LUCKWILL, WEAVER und MACMILLAN (1969) entwickelten eine neue Methode für die Extraktion von Gibberellinsäure und andere Hormone von Apfelsamen während der Fruchtentwicklung am Baum. Sie fanden, daß GA erst 5 Wochen nach der Vollblüte in der Frucht auftritt, seine maximale Konzentration nach 9 Wochen erreicht, danach wieder absinkt und in der Frucht reife verschwunden ist.

FINE und BARTON (1958) weisen auf die mögliche Bedeutung des Alanins bei dem Nachreifeprozess frischgeernteter Samen von "Paeonia" hin. ZAGAJA und HOUGH (1960) fanden in ihren Untersuchungen, daß die Anzahl der Aminosäuren bei Embryonen von frühreifenden Pfirsichsorten geringer als bei spätreifenden ist; ebenso ist sie bei frühreifenden Sorten in frischgeernteten Embryonen geringer als in stratifizierten. BARTON (1961) und BARTON und BRAY (1962 und 67) führten biochemische Untersuchungen über die Keimung und den Nachreifeprozess bei *Paeonia suffruticosa* durch und berichten dabei über die Veränderungen der Kohlehydrate und mancher organischer und Aminosäuren sowie über die Stickstoffsynthese.

Obstsämlinge aus Embryokulturen zeigen häufig Zwergwucherscheinungen und Blattmißbildungen (TUKEY 1933c, LAMMERTS 1942, BRAAK 1957, KRAPP und THEILER 1968 bei Kirschen; DAVIDSON 1933 und 35, KOVÁČOVÁ-FERJANČIKOVÁ (1959), POLLOCK (1959 und 62), LEDBETTER (1960) und FLEMION und BEARDOW 1965 bei Pfirsich, VISSER 1956a bei Äpfeln). FLEMION (1961), FLEMION und TOPPING (1961 und 63), FLEMION und BEARDOW (1963, 64a und 64b) und FLEMION et al. (1967) führten an physiologisch geschwächten und normalen Pfirsichsämlingen morphologische, histologische und cytochemische Untersuchungen hinsichtlich Zwergwuchs und Blattdeformationen durch.

FLEMION und BEARDOW (1965) berichten, daß die Behandlung der Pfirsichkeimlinge mit niedriger Temperatur (9 Wochen bei 5°C) nur bei Pflanzen im Alter von 1-3 Tagen eine Normalisierung des Wachstums brachte. Sie fügen hinzu, daß ältere Sämlinge (ca. 2 Jahre) nach der Kältebehandlung normale Seitentriebe ausbildeten.

Weitere Untersuchungen über die Wärme- und Lichtwirkung auf physiologisch geschwächten Pfirsichsämlingen wurde von LAMMERTS (1943) sowie WANG und BEARDOW (1968) durchgeführt.

ZAGAJA (1962a) versuchte bei geschwächten Kirschsämlingen (von Embryonen aus nicht-nachgereiften Samen) durch Applikation von Gibberellinsäure das anomale Wachstum aufzuheben. Es ergab sich eine signifikante Stimulation des linearen Triebwachstums während die Blattdeformationen durch die Behandlung nicht beseitigt werden konnten.

3. Material und Methoden

In diesem Abschnitt wird ein allgemeiner Überblick über die in den Versuchen verwendeten Kirschsorten und Standardkulturmethoden gegeben. Abweichungen werden jeweils bei den Einzelversuchen näher angegeben.

3.1. Samenmaterial

Tab. 1 gibt das in den Hauptversuchen der Jahre 1967 bis 1969 verwendete Samenmaterial an. Die Samen stammen vorallem von Kultursorten von *Prunus avium*. Daneben konnten in geringem Umfang auch Sauerkirschsorten und *Prunus mahaleb* mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Folgende Sorten und Arten fanden Verwendung:

Prunus avium

"Werdersche Frühe" (in den Versuchen 4.1, 5.1 und 5.2), reift in der 1. Kirschwoche, alle Früchte stammen von einem Baum in Ockstadt.

"Rotterts Braune" (in den Versuchen 4.1, 5.1, 5.2 und 7), reift in der 2. Kirschwoche, die Früchte aller Jahre stammen von einem Baum in Ockstadt.

"Hedelfinger" (in den Versuchen 5.1 und 5.2), reift in der 4. Kirschwoche, alle Früchte stammen von einem Baum in Ockstadt.

"Hüttner 170 x 53" (im Versuch 4.1), eine Vogelkirschselektion. Das Saatgut stammt aus Befruchtung der Selektion 170 x 53 (KÜPPERS 1964), Alle Früchte stammen von einem Baum der Baumschule Küppers in Ravalzhausen.

"silvestris (Partie 15-111)" (in den Versuchen 6.1 bis 6.3 und auch zur Herstellung von Extrakten), Saatgut bei Fa. Eichenberg & Co., Miltenberg/Main. Vorbehandlung: Fruchtfleisch entfernt und nach 14 Tagen Lufttrocknung im Kühlraum lufttrocken bei 0°C gelagert. Nach dem Eintreffen des Saatgutes im Institut für Obstbau im Kühlschrank bei 7 3 aufbewahrt.

Prunus cerasus

"Spanische Glaskirsche" (in den Versuchen 4.1 und 4.2), eine frühe Sauerkirschsorte, alle Früchte stammen von einem Baum der Versuchs-Obstanlage des Instituts für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität, Giessen.

"Schattenmorelle" (im Versuch 7), Gewächshauskreuzung Schattenmorelle x Kassins Frühe (Züchtungsprogramm 1969 Dr. Schmidt, Institut für Obstbau der Justus Liebig-Universität, Giessen), die Kreuzung wurde im Gewächshaus am 7. 3. 69 durchgeführt und die Früchte am 14. 5. 69 geerntet.

Prunus mahaleb

"Heimann 10" (im Versuch 4.1), eine selbstfruchtbare Mahaleb-Selektion, die als Unterlage verwendet wird (KÜPPERS 1963), alle Früchte stammen von einem Baum in Ravolzhausen.

3.2. Termine der Frucht- und Embryoentnahme

Die Entnahme der Früchte begann je nach Sorte und Jahr 36 - 48 Tage nach Vollblüte und endete 48 - 70 Tage nach Vollblüte. Da die Blüten und damit die Früchte eines Baumes an einem bestimmten Entnahmetermin nicht gleich alt waren, waren z.T. erhebliche Schwankungen in der Embryogröße spürbar (s.Tab.1).

3.3. Vorbereitung und Präparation der Embryonen und Embryoachsen

Nach dem Pflücken wurden die Früchte gut gewaschen und getrocknet, bei fortgeschrittener Entwicklung das Fruchtfleisch entfernt und die Kerne zwischen Filterpapier getrocknet.

Alle folgenden Arbeitsgänge wurden unter sterilen Bedingungen in einer Impfkabine ausgeführt: Desinfektion von Arbeitstisch, Fußboden und Armen bis zum Ellbogen mit Natriumhypo-

Tabelle 1

Prozentsatz kultivierbarer Embryonen und ihre Länge bei
Entnahme in verschiedenen Tagen nach der Vollblüte

T 1) % ²⁾ Embryolänge in mm Versuche 1967			T 1) % ²⁾ Embryolänge in mm Versuche 1968		
<u>Werd. Fr.</u>			<u>Werd. Fr.</u>		
38	47	1,0-1,5	38	32	0,5
43	71	2,5-3,0	43	58	1,5-2,5
48	52	4,0-6,0	48	44	3,5-5,5
R 57	43	4,5-6,5	53	46	5,0-6,5
			58	51	5,0-6,5
			R 59	-	-
<u>Rotterts Br.</u>			<u>Rotterts Br.</u>		
38	22	0,5-1,0	38	14	0,5
43	74	2,5-3,0	43	44	1,5-2,5
48	64	4,0-6,5	48	57	4,0-6,5
R 61	56	5,0-7,5	53	62	5,0-7,5
			58	66	5,0-7,5
<u>Pr. avium 170 x 53</u>			63	60	5,0-7,5
43	12	0,5	R 65	-	-
48	82	1,5-2,0			
59	64	5,0-6,0	<u>Hedelfinger</u>		
70	78	5,0-6,0	48	23	1,0-2,0
R 81	-	-	53	31	1,5-4,0
			58	33	2,5-6,5
<u>Span. Glas.</u>			63	46	3,0-6,5
43	43	0,5-1,0	68	57	3,0-6,5
48	51	2,0-3,0	R 72	-	-
59	81	5,0-6,5			
70	77	5,0-6,5			
R 76	-	-			
<u>Pr. mahaleb Heimann 10</u>			<u>Versuche 1969</u>		
48	57	0,5-1,0	<u>Rotterts Br.</u>		
59	86	3,0-5,5	36	19	0,5
70	90	4,0-5,5	41	48	1,5-2,5
R 92	-	-	46	64	3,0-6,0
			51	67	5,0-8,0
			56	54	5,0-8,0
			61	57	5,0-8,0
			R 62	-	-

1) T = Termin der Fruchtentnahme (Tage nach Vollblüte)

2) % = kultivierbare Embryonen von 100 Früchten

3) (Werte in Klammern) = Durchmesser der Früchte in mm

R = Zahl der Tage von Vollblüte bis Frucht reife

chlorit; 40-minütiges Autoklavieren der Pinzette, Kulturgefäße, gefüllt mit Nährlösung usw. bei 2 atü; Bestrahlung der Kabine mit UV für mehrere Stunden; tragen von Kopf- und Mundschutz, sowie Arbeitskittel; Früchte bzw. Steine 3 Minuten lang in 50%iges Äthanol getaucht und zweimal kurz abgeflammt.

Die Präparation der Embryonen aus den Steinen erfolgte bei den ersten Probeentnahmen, bei denen das Perikarp noch weich war und der kleine Embryo einen relativ engen Raum in Richtung Mikropyle einnimmt mit Hilfe einer abgeflamten Rasierklinge, die Früchte liessen sich auf einer Glasplatte quer durchschneiden. Beim Exstirpieren kleiner Embryonen im frühen Stadium der Entwicklung ließen sich die Früchte in fast gleiche Teile schneiden. Bei späteren Probeentnahmen, bei denen die Embryonen etwas größer waren, wurden die Früchte in ungleiche Teile geschnitten. Am kleineren Schnittteil befand sich der Fruchts蒂el; somit konnte die Verletzung des Embryos verhindert werden. Später, als der Embryo fast seine volle Größe erreicht hatte und das Perikarp härter geworden war, konnte man die vom Fruchtfleisch befreiten sterilen Steine knacken, indem man sie in senkrecht ovaler Form zwischen den Schraubstock setzte.

Die freipräparierten Embryonen wurden mit abgeflammter Nadel und Pinzette von den Integumenten und dem Endosperm befreit und entnommen. Kleine Embryonen im frühen Stadium der Entwicklung konnten ohne Infektionsgefahr sogleich in die Kulturgefäße gebracht werden. Ausgewachsene Embryonen wurden vor der Kultivierung durch 3 Minuten langes Einlegen in 30° C warme 12%ige Hypochloritlösung, verdünnt mit Wasser 1 : 20, sterilisiert, danach drei- bis viermal mit sterilem Wasser gewaschen und zur Kultur gebracht (Versuche 4.1, 5.1, 5.2, 7).

Wurden die Embryonen reduziert (v. 6 u. 7), so konnten die Kotyledonen auf steriler Glasscheibe mit abgeflamtem Rasiermesser von der Seite der Chalaza her auf ca. 50 % abgeschnitten werden.

Für die Präparation der Embryoachsen (Versuche 4.2, 5.1, 5.2, 6.1 bis 6.3, 7) wurden die Kotyledonen durch Verschieben voneinander getrennt, da sonst die Gefahr besteht, die Primordialblätter von der Radikula und dem kurzen Hypokotyl zu trennen oder ihre Gewebe zu zerreißen. Zurück bleibt die differenzierte Embryoachse (Radikula, das kurze Hypokotyl, Epikotyl und Plumula) unverletzt an einem Keimblatt. Mit Hilfe einer abgeflamten Nadel und Pinzette lässt sich die Embryoachse leicht von dem Keimblatt lösen (Abb. 1 und 2). Die herausgelösten Embryoachsen wurden sofort kultiviert.

Bei ausgereiften, gelagerten Samen (Versuche 6.1 bis 6.3) war es besonders schwierig, die Embryonen keimfrei zu halten. Deshalb wurden nach dem Knacken der Samen die Embryonen (umhüllt von Integumenten und Endosperm) mit sterilem Wasser in der Impfkabine mehrmals gewaschen. Jeder Embryo für sich allein in einem kleinen Gefäß, gefüllt mit sterilem Wasser, zum Quellen gebracht, Integumente und Endosperm entfernt und die freipräparierten Embryonen 4 Minuten lang in 12%ige Natriumhypochloritlösung, mit Wasser 1 : 20 verdünnt, gelegt, danach mit sterilem Wasser gewaschen.

Für die Angaben über den Zustand der Embryonen wurden bei jeder Entnahme Proben von 100 Samen extra aufgeknackt. Es erfolgte eine Aufteilung in 3 Gruppen:

- a) Normale, gesunde Embryonen: sie zeichnen sich nach Entfernen der Integumente und des Endosperms durch eine glatte Oberfläche der Kotyledonen aus; sie sind weiß und frei von jeder Schrumpfung und Mißbildung.
- b) geschrumpfte oder verkümmerte, aber lebensfähige Embryonen: sie sind im Gegensatz zu den gesunden, gewichtsmäßig leichter an den Innenseiten der Kotyledonen Schrumpfungerscheinungen unterschiedlicher Intensität. Es wurde beobachtet, daß die Embryoachsen trotz Schrumpfung der Kotyledonen normal ausgebildet wie unter (a) waren.



Abb. 1: Mit Hilfe einer Nadel freipräparierte Embryoachse. Nat. Größe



Abb. 2: Differenzierte Embryoachse eines Kirschembryos. Vergr. ca. 45 x.

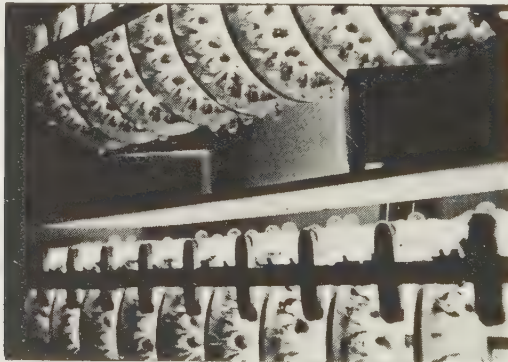


Abb. 3: Anlage zur Durchführung der Embryokultur- die Kulturgefäße sind mit Wattepfropfen verschlossen (entnommen von NEUMANN 1969 b).

c) degenerierte, mißgebildete, nicht lebensfähige Embryonen: bei diesen sehr geschrumpften Embryonen sind die kotyledonaren Gewebe stark reduziert und auch die Embryoachsen oft vom Schrumpfungsprozeß betroffen. Andere Embryonen zeigten die bei TUKEY (1934b) und STÖSSER (1966) berichteten verschiedenen Formen von Mißbildungen.

Für alle Embryokultur-Versuche wurden nur die unter (a) und (b) angeführten Embryonen kultiviert.

Bei der Spätsorte Hedelfinger fiel auf, daß der Anteil der mißgebildeten und geschrumpften Embryonen sehr hoch lag (s. Tab. 1). Außerdem zeigte der Baum während der 2. Phase der Fruchtentwicklung starken Fruchtfall. In diesen Steinen wurden fast nur abortierte Embryonen gefunden. Der relativ hohe Prozentsatz normal ausgebildeter Embryonen in den letzten beiden Probeentnahmen (63 und 68 Tage nach Vollblüte) ist durch den vorherigen Fruchtfall zu erklären.

3.4. Kulturmethoden und Zusammensetzung der Standardnährlösungen

In den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei verschiedene Kulturmethoden verwendet, 1. auf Agarnährmedien und 2. in flüssigen Nährlösungen nach der Auxophytonmethode.

1. Für die Kultur auf Agar dienten drei in ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedliche (s. Tab. 2) Nährmedien,

- a) nach TUKEY, diese sehr einfache Lösung enthält nur Makroelemente und Fe in Form von $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ und ist bisher bei zahlreichen Embryokulturversuchen mit Erfolg verwendet worden.
- b) nach WHITE, eine anorganische Nährlösung mit Mikronährstoffen (Mn, B, Zn und J), bisher vorwiegend verwendet für Gewebekultur des Tabaks.
- c) nach NEUMANN, eine varrierte Lösung, die bei Karotten-Gewebekulturen weite Anwendung findet und neben einer vollständigen anorganischen Lösung einschließlich der Mikroelemente und Fe in Form von EDTA, Casein-Hydolysat sowie Pflanzenhormone (IES, m-Inosit und Kinetin) und andere organische Verbindungen (Thiamin), Nicotinsäure, Pyridoxin und Glycin) enthält.

Tabelle 2

Chemische Zusammensetzung 2 verschiedener Nähmedien für die Aufzucht unreifer Kirschembryonen (mg/Liter)

Nährsalze	TUKEY (1938)	WHITE (1943)	NEUMANN (1965)
KCl	680	65	65
Ca SO ₄	185	-	-
KNO ₃	135	80	872
Ca (NO ₃) ₂	-	200	488
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2,50	-
Na H ₂ PO ₄	-	16,50	234 (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	185	-	-
Fe ₃ (PO ₄) ₂	185	-	-
Na ₂ SO ₄	-	200	245 (Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	360	1080
MnSO ₄	-	4,50 (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	3,58 (MnSO ₄ ·H ₂ O)
H ₃ BO ₃	-	1,50	1,50
Zn SO ₄ ·7H ₂ O	-	1,50	1,46
KJ	-	0,75	0,75
Na ₂ Mo O ₄	-	-	0,28
Cu SO ₄ ·5H ₂ O	-	-	0,62
Fe EDTA	-	-	30
Casein-hydrolysat	-	-	200
<u>Hormonlösung ppm/L</u>			
IES 2			
m-Inosit 50			
Kinetin 0,1			
<u>Vitamin-Lösung</u>			
<u>mg/100ml dest. Wasser</u>			
Thiamin 10			
Nicotinsäure 50			
Pyridoxin 10			
Glycin 10			
davon für die Nährlösung 1 ml/L			
Zusätzlich zu den nötigen Nährstoffen wurde bei allen Nährlösungen 20 g / Liter Saccharose gegeben.			

Zusätzlich zu den nötigen Nährstoffen wurde 0,7 % Difco-Bacto-Agar gegeben.

Bei allen Nährlösungen wurde der pH-Wert auf 5,5 durch 1 n Natronlauge bzw. 1 n Salzsäure eingestellt und ab dem 3. Entnahmetag nur 0,5 % Saccharose gegeben (nur bei vollständigen Embryonen).

Zur Kultivierung wurde jeder Embryo in einem sterilem Reagenzglas (150 mm hoch, 25 mm Ø), gefüllt mit 30 ml Agarnährmedium, kultiviert. Der Embryo wurde mit langer Pinzette möglichst 1 mm tief unter die Oberfläche des Mediums gedrückt. (Embryoachsen wurden auf die Oberfläche dieses Mediums gelegt); durch eine leichte Drehung der Pinzette ließ sich ein kleiner Hohlraum um den Embryo schaffen, der sich im unteren Teil mit angesammelter Flüssigkeit aus dem Medium füllte und dadurch für einige Zeit den Embryo mit Feuchtigkeit und Luft versorgte. Die Kulturgefäße konnten dann mit vorher abgeflammtten Wattepfropfen verschlossen werden. Der Hals der Kulturgefäße wurde jedesmal nach dem Öffnen und vor dem Verschließen abgeflammt.

1. Für die Kultur in flüssigen Nährlösungen wurde die Nährlösung nach NEUMANN (s. Tab. 2) in vielfältiger Variation verwendet (s. Einzelversuche).

In erster Linie diente diese Methode für die Kultivierung freipräparierter Embryoachsen, bzw. reduzierter Embryonen (Diese sogenannte Auxophytonmethode ist ursprünglich von STEWARD, CAPLIN und MILLER (1952) zur Kultur von Karottengewebe entwickelt worden).

Die freipräparierten embryonalen Gewebe ließen sich in speziellen Versuchsgefäßen, gefüllt mit 15 ml sterilisierter flüssiger Nährlösung kultivieren, pro Gefäß in der Regel 3 Embryoachsen, bzw. reduzierte Embryonen. Nach Abflammen des Gefäßhalses wurden sie mit ebenfalls abgeflammtten Wattepfropfen verschlossen und die Gefäße an eine sich mit 1 UpM drehende Mischapparatur (Abb. 3) angebracht. Durch die ständige Umdrehung wurde die Nährlösung gemischt und belüftet; die Gewebe waren abwechselnd der Luft und der Nährlösung ausgesetzt. Die Kulturen wurden kontinuierlich mit 4.000 bis 4.500 Lux belichtet und die ganze Anlage befand sich in einem Raum mit konstanter Temperatur (22°C) und Luftfeuchtigkeit (40 %).

3.5. Temperaturbehandlung

Die Temperaturbehandlung erfolgte im Versuch 4.1 bei 2 Stufen und zwar

- a) durch Lagerung der Kulturgefäße (unmittelbar nach dem Einsetzen der Embryonen) im dunklen Kühlraum 9 Wochen bei $+4^{\circ}\text{C}$.
- b) durch Einstellen ins Gewächshaus unter indirektes Licht bei $18 - 22^{\circ}\text{C}$ und Feuchtigkeit über 60 %, sowie 16 Stunden Tageslicht. Die zusätzliche Lichtquelle war eine Philipps-Quecksilber-Dampflampe (HP 1000 W., Typ ST 213 G).

3.6. Weiterkultur der Sämlinge

Je nach Herkunft der Sämlinge wurden verschiedene Techniken für die Weiterkultur verwendet.

- a) Sämlinge aus Agarkultur konnten in der Regel nach 1 Woche im Gewächshaus mit einer Pinzette aus den Kulturgefäßen entnommen werden, von Agarresten befreit und vorsichtig in sterilem Wasser geschwenkt werden, so daß die anhaftenden Nährlösungsreste von den Geweben entfernt wurden. Dann erfolgte das Eintopfen in mit Einheitserde (Typ L) gefüllte 6 cm Jiffypots, die 1 Woche lang im Gewächshaus (s. oben) mit lichtdurchlässigem Plastik zugedeckt waren. Je nach Entwicklungsgrad konnten die Sämlinge 5 - 8 Wochen später in 12-cm Tontöpfe umgesetzt werden. Nach viermonatiger Kultur im Gewächshaus wurden sie dann 12 Wochen lang zur Ruheperiode im Kühlraum bei $+6^{\circ}\text{C}$ abgestellt und anschließend wieder ins Gewächshaus gebracht. Im April kamen die Töpfe in Frühbeete und die Zwischenräume sowie die Oberfläche der Töpfe wurden mit Torf aufgefüllt, in der Nacht und bei Frostgefahr zum Schutz mit einem Lattenrost abgedeckt. Mitte Mai konnte bei wolkeigem Wetter das Auspflanzen ins Freiland durchgeführt werden. Die Sämlinge wurden im Abstand von 40 cm in Reihen ausgesetzt. Die Reihen hatten, um ordentliche Bearbeitung zu ermöglichen, Zwischenräume von 70 cm.

b) Sämlinge aus flüssiger Kultur konnten in der Regel 6 -

8 Wochen nach Versuchsbeginn den Gefäßen entnommen und vorsichtig in Wasser gespült werden. Um die Seitenwurzelbildung anzuregen, wurden die Wurzeln auf 10 - 20 mm verkürzt und die Jungpflanzen in Wasserkultur überführt. Für diese Kultur wurden nur die bei der Nährlösung nach NEUMANN aufgeführten Mineralstoffe (s. Tab. 2) verwendet. Die mit flüssiger Nährlösung gefüllten Reagenzgläser (150 mm hoch, 25 mm Ø) wurden mit kräftiger Alufolie abgedeckt, in die ein Loch für das Hindurchstecken der Sämlingswurzel gestochen wurde. Die Temperatur im Kulturraum betrug konstant +20° C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 70 und 90 %. In Tischhöhe wurde Licht von 5000 Lux gemessen (Philipps TL 40 W/55). Täglich wurden die Pflanzen in mit frischer Nährlösung gefüllte Reagenzgläser umgesetzt. Nach 3 - 6 Wochen Wasserkultur wurden die Pflanzen im Gewächshaus, im Kühlraum und später im Freiland wie unter (a) behandelt.

3.7. Herstellung von Extrakten aus nachgereiften (stratifizierten) Kirschsamen

Für die Extraktion wurden die Samen (Pr. avium silvestris P. 15111, s.S. 19) 16 Wochen in feuchtem Sand bei 7 - 9°C in einem Kühlraum stratifiziert. Nach Beendigung der Nachreifezeit wurden die Steinschale, die Integumente und das Endosperm entfernt, die Embryonen mit destilliertem Wasser gewaschen und je nach Extraktionsmethode wie folgt extrahiert.

Zerquetschte Embryonen (Heiß)

Die Embryonen wurden mit einem Mörser zerquetscht und die 1 - 4 Embryonen entsprechende Menge Gewebematerial in die Kulturgefäße gegeben und 40 Minuten autoklaviert.

Wasserextrakt (Heiß)

100 Embryonen wurden in 200 ml destilliertem Wasser mit dem Mixer fein zerkleinert und 20 Minuten lang gekocht. Nach

der Abkühlung wurde, um die Eiweißbestandteile zu entfernen, 200 ml 10%ige Trichloressigsäure zugegeben. Nach 4 - 6 Stunden im Kühlschrank wurde der Extrakt zweimal filtriert und am Rotationsverdampfer bei $+30^{\circ}\text{C}$ eingedampft; danach wurden die Substanzen in 20ml destilliertem Wasser aufgenommen. 0,2 ml des Extraktes entsprach 1 Embryo.

Preßsaft (Kalt)

100 Embryonen wurden eingefroren und ausgepreßt; der dadurch entstehende Saft wurde in 200 ml destilliertem Wasser aufgenommen, wie oben erwähnt eingedampft und wieder mit Wasser aufgenommen. 0,2 ml des Saftes entsprach 1 Embryo.

Äthanolextrakt (Kalt)

100 Embryonen wurden in 200 ml 75%igem Äthanol mit dem Mixer fein zerkleinert. Die fett- und wasserlöslichen Substanzen wurden mit je 100 ml Chloroform und H_2O 1:1 im Schütteltrichter 20 Minuten lang gemischt und der ganze Vorgang nochmal wiederholt; für den nächsten Vorgang wurden nur die wasserlöslichen Fraktionen verwendet. Sie wurden filtriert und am Rotationsverdampfer eingedampft, die Rückstände in 20 ml destilliertes Wasser aufgenommen. 0,2 ml des Extraktes entsprach 1 Embryo.

Preßsaft und Äthanolextrakt wurden kalt zur vorher autoklavierten und wieder abgekühlten Nährlösung gegeben. Zur Kontrolle wurden die Extrakte mit der Nährlösung in den Kulturgefäßen autoklaviert (heiß).

Sollten die Extrakte kalt zugegeben werden, so wurden sie mehrmals filtriert (Rotband) und in der Impfkabine mit steriler Spritze durch einen Mikrofilter in ein autoklaviertes Gefäß gespritzt. Aus diesem Gefäß konnten die Extrakte in der gewünschten Menge mit einer Pipette in die Kulturgefäße zur Nährlösung gegeben werden.

3.8. Bonitierung, Messung und Auswertung

Bei den in-vitro kultivierten Embryonen und Embryoachsen erfolgten Bonitierungen des Wachstums dreimal wöchentlich, unter Berücksichtigung insbesondere der Volumenzunahme der Gewebe, der Entfaltung der Primordialblätter, der Bildung der grünen Farbe in den Blättern, Wachstum von Sproß bzw. die Ausdehnung der Radikula, die Ausbildung von Seitenwurzeln sowie die weitere Entwicklung der Sämlinge hinsichtlich der Wachstumsanomalien.

Da die vorliegenden Untersuchungen mit freipräparierten Embryonen und nicht mit intakten Samen durchgeführt wurden, wird der Ausdruck "Keimung" nicht gebraucht. Es wird deshalb von Wachstum und Entwicklung des Sproßes bzw. der Wurzel gesprochen.

Das embryonale Gewebe ist zu Jungpflanzen ausgewachsen, wenn die Radikula eine Länge von 10 mm erreicht hat und die Primordialblätter mindestens 4 mm groß sind. Die Erfahrung zeigt, daß die Sproße und Wurzeln nach den gegebenen Messungen ihr Wachstum weiter fortsetzen.

Bei Entnahme der Sämlinge aus dem Kulturgefäß konnten die Messungen der Wurzellänge (von Wurzelspitze bis Wurzelhals, ohne Hypokotyl), Sproßlänge (von Sproßspitze bis zu den Keimblättern, ohne Hypokotyl), das Zählen der Blätter vorgenommen, sowie weitere Besonderheiten bonitiert werden.

Bei den in Töpfen bzw. im Freiland gewachsenen Sämlingen wurde die Höhe der Pflanzen (von Bodenoberfläche bis Sproßspitze), die Anzahl der Blätter (einschließlich der abgefallenen an den Blattnarben) und Blattachselknospen ermittelt, sowie der Durchmesser des Sproßes 1 cm über der Bodenoberfläche gemessen.

Die Beurteilung der Versuche erfolgte quantitativ durch die Anzahl der embryonalen Gewebe, die 3 - 4 Tage nach Kulturbeginn eine bestimmte Wachstumstendenz zeigen; solche mit Wachstum von Sproß und Wurzel, andere, die nur Sproß- oder nur Wurzelwachstum zeigten, weitere ohne Wachstum (sistierte) oder infolge einer Infektion nicht mehr wachstumsfähige (Ausfälle). Die Angaben über die Anzahl werden entweder in absoluten Zahlen oder in Prozentsätzen angeführt.

In qualitativer Hinsicht wird die Auswertung der Versuche durch Angaben von Messungen des Wurzel- und Sproßwachstums im Zusammenhang mit dem Zustand der Sämlinge, der Überlebensrate, sowie der weiteren Entwicklung hinsichtlich der Wachstumsanomalien durchgeführt.

4. Versuche mit unreifen Embryonen und Embryoachsen unter Variierung verschiedener Faktoren (1967)

1967 kamen zwei Serien von Experimenten zur Durchführung und zwar (1) Versuche mit unreifen Embryonen verschiedener Sorten und Arten und (2) Versuche mit Embryoachsen unreifer Embryonen von einer Sauerkirschsorte. Im wesentlichen handelt es sich um Vergleiche verschiedener, bekannter Methoden, die dazu dienen sollten, Erfahrung zu sammeln, Techniken zu erlernen und das Verhalten der Embryonen unter verschiedenen Bedingungen zu erfassen.

4.1. Versuche mit unreifen Embryonen auf Agarmedien

Dieser einleitende Versuch galt der Nachprüfung einer Reihe methodischer Fragen, wobei sich 4 Faktoren einbeziehen liessen:

- a) Es sollte einmal das Verhalten verschiedener Kirschsorten und -arten geprüft werden. Es fanden Verwendung:
- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Prunus avium mit den Sorten | 1) Werdersche Frühe |
| | 2) Rotterts Braune |
| | 3) Hüttner 170x53 (Samenspender) |
| Pr. cerasus mit der Sorte | 4) Spanische Glaskirsche |
| Pr. mahaleb mit der Sorte | 4) Heimann 10 (Samenspender) |
- (Nähere Angaben s. S. 19 und Tab. 1)
- b) Von besonderem Interesse war der Einfluß des Entnahmetermins der Embryonen auf den Anteil lebensfähiger Sämmlinge, die sich bei der in-vitro-Kultur entwickeln können. Je nach Sorte und Art wurden 4 (3) Entnahmeterminen gewählt, die zwischen 38 - 48 Tagen nach Vollblüte begannen und mit der Reife der Frucht endeten (s. Tab. 1 und Tab. 3).
- c) Es erschien weiterhin wesentlich, in diesen einleitenden Versuchen den Einfluß einer Temperaturbehandlung zu prüfen; dies erfolgte in 2 Temperaturbereichen

- 1) bei Normal-Temperaturen (N), wobei die 6 Wochen in-vitro kultivierten Embryonen anschließend sofort in das Gewächshaus umgesetzt wurden (s. S. 28).
- 2) mit Kältebehandlung (K), wobei die in-vitro kultivierten Embryonen zunächst 9 Wochen im Kühlraum (s. S. 28) standen und später ins Gewächshaus umgesetzt wurden.

d) Schließlich wurde die Zusammensetzung der Nährlösungen der Agarmedien variiert. Im Zusammenhang mit den sehr unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Embryonen und den hiervon abzuleitenden Anforderungen hinsichtlich der organischen und anorganischen Ernährung durch das Kulturmedium an den verschiedenen Entnahmeterminen erschien die Verwendung der Lösungen nach TUKEY, WHITE und NEUMANN (s. S. 25 und Tab. 2) zweckmäßig.

Je Versuchsglied wurden 20 Embryonen in Reagenzgläsern auf Agarmedium kultiviert (s. Abschnitt 3) (Kulturgefäße mit geschrumpften Embryonen wurden extra gezeichnet).

Die 4 Faktoren konnten nicht in einem vollständigen faktoriellen Versuch kombiniert werden. Die Temperaturbehandlungen wurden bei allen anderen einbezogenen Faktoren durchgeführt, der Vergleich der Nährlösungen nur bei den Sorten Werdersche Frühe und Rotterts Braune, der Vergleich der Sorten und Arten nur in der Nährlösung nach TUKEY. Auch die Entnahmetermine schwankten in gewissem Umfange, je nach Sorte und Reifedauer (s. hierzu auch Tab. 1 und 3).

Ergebnisse:

Die Ergebnisse des Gesamtversuches sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die fünf verwendeten Arten und Sorten, die nur in der Nährlösung nach TUKEY miteinander vergleichbar sind, und die nach der Gesamtentwicklungsdauer der Früchte zwei Gruppen bilden (mit kurzer Entwicklungszeit = Werdersche und Rotterts, 38 - 59 Tage; mit langer Entwicklungsdauer = Hüttner 170 x 53, Spanische Glas und Heimann 10, bei Berücksichtigung der

Tabelle 3

In vitro Wachstum unreifer Kirschembryonen in Abhängigkeit vom Entnahmeterrnin, Zusammensetzung der Nährlösung und Temperaturbehandlung

Sorte	T ¹⁾	Anzahl gewachsener Pflanzen von 20 Embryonen Nährlösung und Temperaturbehandlung					
		F u k e y N ²⁾ K ²⁾		W h i t e N K		N e u m a n n N K	
Werd.	38	0(0)	5(0)	0(0)	4(0)	0(0)	6(0)
Frühe	43	6(1)	13(3)	1(0)	6(1)	0(1)	12(0)
	48	10(4)	17(2)	2(0)	6(1)	7(1)	18(2)
	59	0(0)	17(6)	0(0)	0(0)	0(0)	15(3)
Summe		16(5)	52(11)	3(0)	16(2)	13(2)	49(5)
Rotterts	38	0(0)	2(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0)
Braune	43	5(2)	14(7)	3(0)	3(0)	4(0)	14(2)
	48	9(4)	18(5)	3(0)	5(1)	3(2)	15(4)
	59	5(2)	16(6)	0(0)	3(1)	5(1)	16(4)
Summe		19(8)	50(18)	6(0)	11(2)	17(3)	46(10)
Hüttner	43	0(0)	6(0)				
170 x 53	48	0(0)	17(6)				
	59	3(0)	14(10)				
	70	3(0)	17(8)				
Summe		15(0)	54(24)				
Spanische	43	2(0)	6(2)				
Glask.	48	9(5)	16(9)				
	59	3(1)	13(4)				
	70	0(0)	15(3)				
Summe		14(6)	50(18)				
Heilmann	48	8(2)	11(0)				
10	59	10(4)	19(2)				
	70	6(2)	18(2)				
Summe		24(8)	48(4)				

¹⁾T = Entnahmeterrnin in Tagen nach Vollblüte

²⁾Temperaturbehandlung N = nach 6 Wochen in vitro Kultur
Umsetzen ins Gewächshaus mit Normal-
temperaturen
K = in-vitro-Kultur von 9 Wochen bei
4° C, danach ins Gewächshaus mit
Normaltemperaturen

³⁾Werte in Klammern = Anzahl der Pflanzen, die im Ge-
wächshaus weitergewachsen sind.

Tabelle 4

In-vitro-Wachstum verschiedener Kirschsorten und -arten
in Agarmedium nach TUKEY mit und ohne Kältebehandlung

Sorten- gruppe	Sorte	Entn. Termin	Prozentsatz ohne Kälte	gewachs. Pflanzen mit Kältebeh.
kurze Reife- zeit	Werd.		n = 80	n = 80
	Frühe	38 -	20 %	65 %
	Rott. Braune	59	24 %	63 %
lange Reife- zeit	Hüttner		n = 80	n = 80
	170 x 53	48 -	25 %	80 %
	Spanische	70	20 %	73 %
	Glask. Heimann 10	Tage	40 %	80 %

n = Anzahl der in vitro kultivierten Embryonen

Entnahmetermine von 48 - 70 Tagen) wiesen bei Kältebehandlung einen Anteil gewachsener Pflanzen zwischen 63 und 80 % auf, während ohne Kältebehandlung nur 20 - 40 % der Embryonen auswuchsen (Tab. 4).

Hinsichtlich des Entnahmetermins der Embryonen ergaben sich ebenfalls bei Berücksichtigung der Ergebnisse in der Nährlösung nach TUKEY und bei den beiden Temperaturbehandlungen sehr gute Übereinstimmungen bei allen 5 Sorten, wie in Abb. 4 deutlich wird. Vier Sorten zeigten 48 Tage nach Vollblüte ein Maximum im Prozentsatz gewachsener Embryonen, lediglich bei Pr. mahaleb Heimann 10 ist dieses Maximum auf 59 Tage nach Vollblüte verschoben. Weiterhin geht aus der Darstellung hervor, daß der Prozentsatz gewachsener Embryonen mit Kältebehandlung nach diesem Maximum nicht wesentlich absinkt, während Embryonen ohne Kältebehandlung einen starken Abfall aufweisen, d. h. bei diesen macht sich in zunehmendem Maße die Embryodormanz bemerkbar.

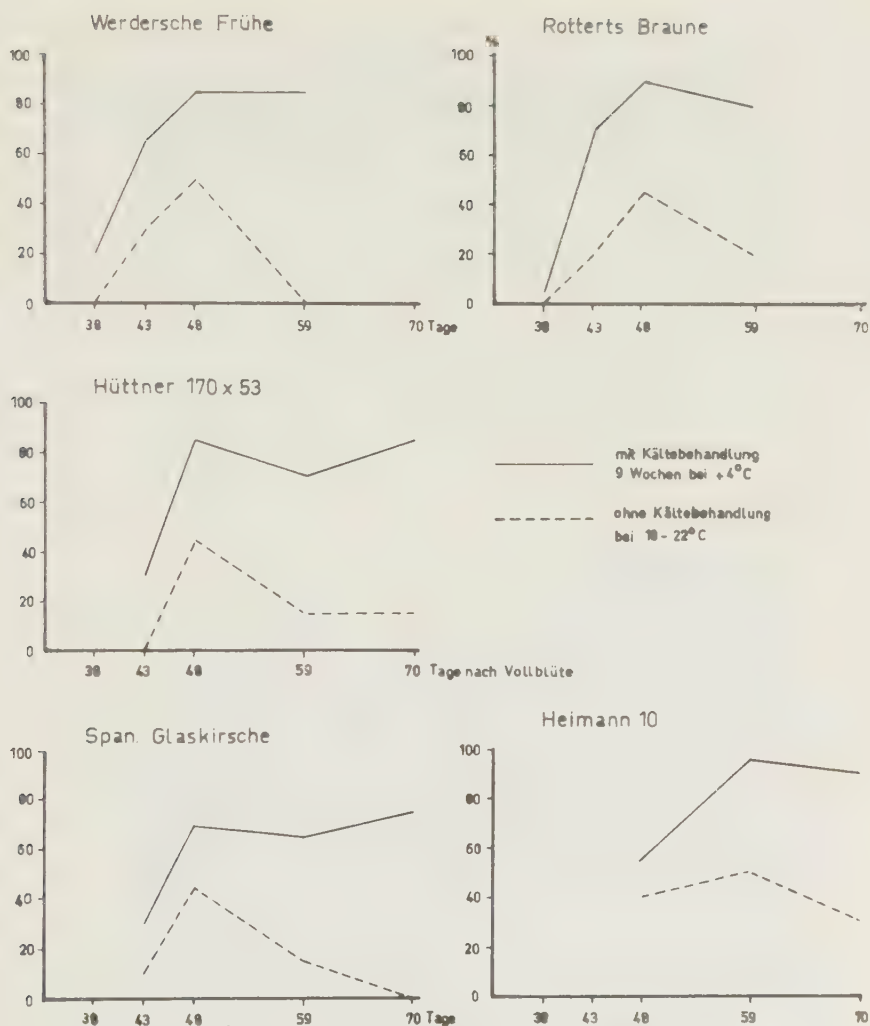


Abb. 4: Einfluß des Entnahmetermins und der Kältebehandlung auf Prozentsatz gewachsener unreifer Kirschembryonen auf Agarmedium nach TUKEY (Versuch 1967).

Für das Wachstum und die weitere Entwicklung in vitro kultivierter unreifer Kirschembryonen spielt, wie die oben angegebenen Ergebnisse zeigen, die Behandlung mit niedriger Temperatur eine wichtige Rolle. Durch 9 Wochen Kältebehandlung bei $+4^{\circ}\text{C}$ konnte die Zahl der zu Jungpflanzen ausgewachsenen Embryonen erheblich gesteigert werden. Dies ließ sich bei allen kultivierten Embryonen unabhängig von Art und Sorte, und bei den genannten Entwicklungsstadien der Embryonen feststellen.

Bereits 38 Tage nach der Vollblüte konnte z.B. bei der Frühsorte Werdersche Frühe der Prozentsatz der zu Jungpflanzen ausgewachsenen Embryonen je nach Kulturmedium von 0 % bei der Kontrolle auf 20 bis 30 % und 43 Tage nach der Vollblüte von 5 % auf 30 bis 60 % verbessert werden (Tab. 3, Abb. 4).

Die Kältebehandlung der in-vitro kultivierten unreifen Embryonen erhöht nicht nur die Zahl der zu Jungpflanzen ausgewachsenen Embryonen erheblich, sondern führte auch zur Kräftigung der Sämlinge (Tab. 5); die Pflanzen gerieten jedoch durch diese Behandlung in eine für die Umsetzung und weitere Aufzucht sehr ungünstige Jahreszeit. Die hohen Ausfälle nach der Umsetzung wurden in erster Linie durch Mikroorganismenbefall verursacht. Auch ZAGAJA (1964) fand, daß trotz der Bodensterilität und Sprühen der Sämlinge mit Fungiziden die Verluste von abfaulenden Pflanzen sehr groß blieben.

Weiterhin ist zu bemerken, daß die Sämlinge, die von sehr jungen, kaltbehandelten Embryonen (38 Tage nach der Vollblüte) stammen, dünn, die Blätter wegen schwacher Chlorophyllausbildung hellgrün gefärbt und besonders empfindlich sind. Mit steigendem Alter der kultivierten Embryonen wurde das spätere Sämlingswachstum zunehmend kräftiger.

Tabelle 5

Sproß- und Wurzelwachstum in vitro kultivierter unreifer Kirschembryonen in Abhängigkeit von Temperaturbehandlungen und Zusammensetzung des Agar Nährmediums (1967)

Nähr- lösung	Sorte	Sproßlänge		Wurzelbildung*	
		N ¹⁾	K ²⁾	N ¹⁾	K ²⁾
TUKEY	1) Werd. Frühe	9,4	18,8	2,8	4
	2) Rott. Br.	11,8	18,2	3,1	4
	(1 und 2) $\bar{X}$	10,6	18,5	3,0	4
	3) Hütt. 170x53	10,1	21,3	2,8	4
	4) Span. Glask.	10,4	18,1	2,2	4
	5) Heimann 10	18,8	27,8	3,0	4
	(1 - 5) $\bar{X}$	12,1	20,8	2,8	4
WHITE	1) Werd. Frühe	8,3	12,7	1,7	2,1
	2) Rott. Br.	5,8	10,0	2,0	2,5
	$\bar{X}$	7,0	11,4	1,9	2,3
NEUMANN	1) Werd. Frühe	8,3	17,6	1,5	3,8
	2) Rott. Braune	7,1	14,0	1,8	2,6
	$\bar{X}$	7,7	15,8	1,7	3,2

- 1) N = nach in-vitro-Kultur direkt ins Gewächshaus (18 - 22°C)
K = nach in-vitro Kultur 9 Wochen bei +4°C, danach ins Gewächshaus
- 2) Das Wurzelwachstum wurde wie folgt klassifiziert
 - 1 = nur Hauptwurzel (Radikula) unter 10 mm lang.
 - 2 = nur Hauptwurzel (Radikula) über 10 mm lang.
 - 3 = Hauptwurzel mit 1-3 Seitenwurzeln, jede über 10 mm lang
 - 4 = Hauptwurzel mit mehr als 3 Seitenwurzeln, jede über 10 mm lang.

Neben den erwähnten Vorteilen der Kältebehandlung soll hier besonders darauf hingewiesen werden, daß durch sie der Zwergwuchs verhindert wird und das weitere Wachstum der Sämlinge bis auf wenige Ausnahmen normal verläuft. (Abb. 5, 6, Tab. 6). Ohne Kältebehandlung wurde bei relativ vielen Sämlingen nach ca. 4 Monaten anomales Wachstum beobachtet. Dieses wird nach zwei morphologisch verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet.

Tabelle 6

Wachstums-Anomalien bei in-vitro kultivierten unreifen Kirschembryonen in Abhängigkeit von der Temperaturbehandlung

Sorte	Wachstum	Behandlung			
		Kontrolle direkt im Gewächshaus		9 Wochen bei +4°C, danach im Gewächshaus	
		N	%	N	%
Werd. Frühe (n = 240)	insgesamt *	32	(13)	117	(49)
	davon: **)				
	normal **)	11	(33)	109	(94)
	anomal **)	21	(67)	8	(6)
Rotterts Braune (n = 240)	insgesamt	42	(18)	107	(45)
	davon:				
	normal	16	(38)	104	(97)
	anomal	26	(62)	3	(3)
Pr. avium (n = 80)	insgesamt	15	(19)	54	(68)
	davon:				
	normal	4	(27)	49	(91)
	anomal	11	(73)	5	(9)
Spanische Glaskirsche (n = 80)	insgesamt	14	(18)	50	(63)
	davon:				
	normal	8	(57)	48	(96)
	anomal	6	(43)	2	(4)
Pr. mahaleb (n = 60)	insgesamt	24	(40)	48	(80)
	davon:				
	normal	14	(58)	48	(100)
	anomal	10	(42)	0	(0)

*) Der angegebene %-Satz bezieht sich auf die Anzahl der insgesamt kultivierten Embryonen

**) Der angegebene %-Satz bezieht sich auf die Anzahl der insgesamt gewachsenen Embryonen

Erstens Sämlinge, die durch Zwergwucherserscheinungen geschwächt sind und zweitens solche, bei denen Sproß- bzw. Blattdeformationen auftreten. Bei den erstgenannten wird das Sämlingswachstum durch eine absterbende bzw. in ihrem Wachstum stark gehemmte Sproßspitze erheblich geschwächt. Sie sind gekennzeichnet durch stark gestauchte Internodien



Abb. 5: Jungpflanzen aus unreifen Embryonen (48 Tage nach Vollblüte) auf Agarnährmedium nach TUKEY der Sorte Rotterts Braune nach 4 Wochen im Gewächshaus. Natürl. Größe
links: 9 Wochen bei $+4^{\circ}\text{C}$, danach ins Gewächshaus.
rechts: direkt ins Gewächshaus



Abb. 6: Nach der Embryokultur umgetopfte Sämlinge (4 Mon. alt)
links: aus kaltbehandelten Embryonen
rechts aus nicht kaltbehandelten Embryonen



Abb. 7: Nach der Embryokultur umgetopfte Sämlinge aus unreifen Embryonen, die im Wachstum Abnormität zeigen
links: Sämlinge mit Blattdeformationen
rechts: Sämlinge mit Zwergwuchs

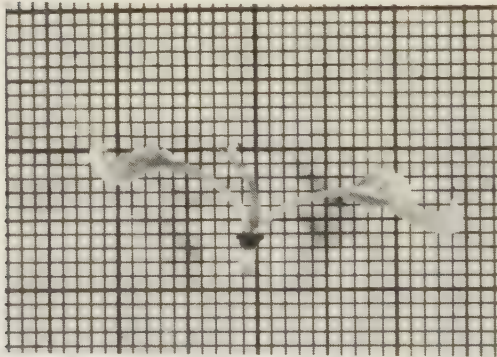


Abb. 8: Blattentfaltete Embryoachse nach 4 Wochen Kultur in vitro (keine Wurzelbildung).

und dunkelgrüne Blätter. Die zweite Gruppe der anomal wachsenden Sämlinge zeigt neben gehemmten Wachstum verschiedene Blattmißbildungen. Es entwickeln sich Blätter mit zu langem Stiel, verdrehter Mittelrippe und gekräuselter Blattfläche in unterschiedlicher Anzahl am Trieb. Manche der deformierten Blätter besitzen weiße Flecken oder Streifen (Elefantenhoren) (Abb. 7).

Der Anteil der so mißgebildeten Sämlinge lag bei ca. 15 % von den gesamten anomal wachsenden Sämlingen. Durch 12 Wochen andauernde Kältebehandlung konnten die Zwergwuchsercheinungen beseitigt werden, die Blattdeformationen jedoch nicht restlos. Nach Beendigung dieser Ruheperiode bildeten die überlebenden Sämlinge neue Sprosse aus den achselständigen Knospen, die aus den zwergwüchsigen Sämlingen normal weiter wuchsen. Die neuen Sprosse aus den durch Blattdeformationen gekennzeichneten Sämlingen zeigen dagegen auch weiterhin vereinzelt Blattmißbildungen.

Wegen Schwachwüchsigkeit und Abnormität war die Überlebensrate nach der Kältebehandlung gering (22 %). Zahlreiche Sämlinge fielen hauptsächlich durch Pilzbefall aus.

Bei allen Versuchsgliedern konnten die geschrumpften Embryonen in gekennzeichneten Kulturgefäßen nicht zu Jungpflanzen auswachsen, auch die Kältebehandlung regte ihr Wachstum nicht an.

Hinsichtlich der drei verwendeten Nährlösungen zeigte sich, daß das Agarnährmedium nach TUKEY, unabhängig von den anderen Versuchsgliedern, die besten Voraussetzungen für das Wachstum der Embryonen und die Entwicklung der ausgewachsenen Jungpflanzen erbrachte. Obwohl der prozentuale Anteil der ausgewachsenen Jungpflanzen, der auf dem Agarnährmedium nach NEUMANN kultivierten Embryonen fast so hoch wie der nach TUKEY lag, erwies es sich für die Wurzelbildung als ungünstig.

Die Wurzeln waren kurz und dick und die Bildung von Nebenwurzeln sehr gering. Dadurch wurde, wie später noch erwähnt wird, das weitere Wachstum der Sämlinge negativ beeinflusst. Die auf dem Medium nach WHITE kultivierten Embryonen zeigten anzahlmäßig die geringste Entwicklung zu Jungpflanzen und das schwächste Sproß- und Wurzelwachstum (s. Tab. 3 und 5).

4.2. Versuche mit Embryoachsen von unreifen Kirschembryonen

Eine zweite Serie von Versuchen befaßte sich vornehmlich mit dem in-vitro-Wachstum von E m b r y o a c h s e n in flüssigem Nährmedium und auf Agarmedien.

Verwendung fand die Sorte Prunus cerasus "Spanische Glas", deren Samen an 2 Terminen, nämlich 59 Tage und 70 Tage nach Vollblüte entnommen wurden. Auf eine frühere Entnahme wurde deshalb verzichtet, weil die Präparation der Achsen von sehr jungen Embryonen nicht möglich war, da diese nicht voll-
ausgebildet sind.

Folgende Behandlungen kamen zur Anwendung:

- a) flüssiges Nährmedium nach NEUMANN (s. Tab. 2), wobei ein Vergleich der Nährlösungen mit (Standard-Lösung) und ohne Kinetin vorgenommen und Embryoachsen und Embryonen einbezogen wurden (jeweils 30/Versuchsglied)
- b) Agar-Nährmedien mit den Nährlösungen nach TUKEY und NEUMANN, bei denen jeweils die Zuckerkonzentrationen variiert wurden, nämlich mit 0,5; 1,0; 2,0 und 5,0 % Saccharose. In diesem Versuch konnten je Behandlung 20 Embryoachsen Verwendung finden. Ein Vergleich mit vollständigen Embryonen war durch den parallel hierzu laufenden Versuch 4.1 gegeben

In allen Fällen wurde keine Kältebehandlung vorgenommen.

Ergebnisse

- a) In der flüssigen Nährlösung nach NEUMANN begannen 87 % der Embryoachsen bei Anwesenheit von Kinetin bereits nach 2 - 5 Tagen ihre Primordialblätter zu entfalten (Tab. 7).

Tabelle 7

Blattentfaltung bei unreifen Embryoachsen und Embryonen der
Sorte Spanische Glas in flüssiger Nährlösung nach NEUMANN
mit und ohne Kinetin.

Entnahme- Termin	Kultiv. Gewebe	n	Anzahl mit *) Blattentfaltung		Grünfärbung d. Gewebe	
			+ Kin.	- Kin.	+ Kin.	- Kin.
59 Tage	E-Achsen	30	26	6	+++	+
	Embryonen	30	12	0	+++	+
70 Tage	E-Achsen	30	26	3	+++	+
	Embryonen	30	5	0	+++	+

n = gesamte Anzahl kultivierter unreifer Embryonen bzw.
Embryoachsen

*) Anzahl von je 30 kultivierten Geweben

**) +++ = intensive Grünfärbung

+ = schwache Grünfärbung

4 Wochen später hatten sich 2 - 6 normal entfaltete Blättchen entwickelt, die zwischen 6 - 22 mm lang und 4 - 12 mm breit waren (Abb. 8).

Diese kleinen Blätter zeigten eine kräftige grüne Farbe und dürften somit die Fähigkeit besitzen, assimilieren zu können. Bis 5 Wochen nach Kulturbeginn blieb jede Wurzelbildung aus. Die Radikula zeigte eine leichte Streckung von höchstens 2 - 3 mm. Da keine Wurzelbildung vorhanden und die flüssige Nährlösung durch Verdunstung unterschiedlich reduziert war, wurden die Blätter hellgrün mit braunen Rändern, die sich später über das ganze Blatt zogen und ein Zeichen für das Absterben der Gewebe darstellten. Das Umsetzen in frische Nährlösung hatte keinen Einfluß auf die Wurzelbildung.

Bei den 59 und 70 Tage alten (vollständigen) Embryonen zeigten nur 40 bzw. 17 % schwache Primordialblattentfaltung. Die Kotyledonen färbten sich kräftig grün. Wurzelbildung konnte auch hier nicht beobachtet werden.

In Abwesenheit von Kinetin war die Anzahl wachsender Embryoachsen gering. Die Blattentfaltung war hier wesentlich schwächer als in Anwesenheit von Kinetin. Die entfalteten Blättchen färbten sich nur blaßgrün. Bei der Kontrolle (ganze Embryonen) färbten sich die Kotyledonen nur zum Teil hellgrün.

b) Auf Agarnährmedien mit den Nährlösungen nach TUKEY und nach NEUMANN konnten die kultivierten Embryoachsen nicht weiterwachsen. Die Variierung der angegebenen Zuckerkonzentrationen im Medium regte offenbar weder das Austreiben von Sproßen noch die Ausbildung von Wurzeln an. Die Embryoachsen schwellen 8 - 10 Tage nach Kulturbeginn mehr oder weniger leicht an und färbten sich blaßgrün. Zwischen den verschiedenen Versuchsbehandlungen ließ sich kein Unterschied im Wachstum feststellen.

5. Versuche mit unreifen Embryonen und Embryoachsen in flüssiger Nährlösung und verschiedener Weiterkultur (1968)

In diesen Untersuchungen (1968) wurden drei Versuche durchgeführt.

- 5.1. in flüssiger Nährlösung nach Auxophytonmethode
- 5.2 Variierung von Hormonen und Vitaminen in der Nährlösung
- 5.3 Umsetzen auf Agarnährmedien und in Einheitserde unter verschiedenen Kulturbedingungen

5.1. In flüssiger Nährlösung nach Auxophytonmethode

Dieser Versuch befaßt sich mit dem in-vitro Wachstum von Embryonen bzw. Embryoachsen unter Berücksichtigung folgender Faktoren:

- a) Um Näheres über den Entwicklungsverlauf der embryonalen Dormanz während der Fruchtentwicklung am Baum zu erfahren, wurden die Entnahmetermine der Embryonen in regelmäßigen Intervallen von 5 Tagen bis zur Frucht reife durchgeführt (s. Tab. 1 und 8).
- b) Weiter wird die Wirkung des Kinetins und seine Wichtigkeit in der Nährlösung hinsichtlich des Wachstums der Embryonen sowie die weitere Entwicklung der Pflanze nochmal, nach dem dies in dem letzten Versuch (s. 5.2) erkannt wurde, nachgeprüft. Hierzu diente die Nährlösung nach NEUMANN (s. Tab. 2), wobei ein Vergleich der flüssigen Nährlösung mit und ohne Kinetin beabsichtigt war.
- c) In diesen Versuchen sollte die Wirkung der Kotyledonen-Entfernung untersucht werden, wobei Embryonen bzw. Embryoachsen einbezogen wurden (Zahl je Versuchsglied in den ersten beiden Entnahmen 40 Embryonen und bei späteren Entnahmen 20 Embryonen bzw. Embryoachsen).
- d) Für die Untersuchungen fanden drei Sorten Verwendung, nämlich Werdersche Frühe, Rotterts Braune sowie die Sorte Hedelfinger als Spätsorte.

Tabelle 8

Wachstum in-vitro kultivierter unreifer Embryonen von drei Süßkirschsor ten in Abhängigkeit von Kotyledonenentfernung, dem Reifegrad des Embryos und Kinetinzugabe (1968)

Sorte und Zahl	Entn.-T. je Versuchsgl.		Anzahl der Embryonen mit Wachstum von Sproß u. Wurzel				Anzahl der Embryoachsen m. Wachstum von nur Sproß	
	T ¹⁾	n ²⁾	+Kin.	-Kin.	+Kin.	-Kin.	+Kin.	-Kin.
Werd.	38	40	8	0	7	5	-	-
Frühe	43	40	10	0	13	6	-	-
	48	20	2	0	11	2	16	4
	53	20	0	0	3	0	17	7
	58	20	0	0	2	0	16	6
Rott.	38	40	4	0	10	7	-	-
Braune	43	40	12	0	9	4	-	-
	48	20	0	0	13	8	14	4
	53	20	0	0	3	2	17	4
	58	20	0	0	2	1	16	3
	63	20	0	0	3	2	18	5
Hedel-	48	40	4	0	6	2	-	-
finger	54	40	6	0	9	3	-	-
	58	20	2	0	3	2	11	4
	63	20	0	0	5	0	16	6
	68	20	0	0	3	1	16	5

1) T = Entnahmet ermin in Tagen nach Vollblüte

2) n = gesamte Anzahl kultivierter unreifer Embryonen bzw. Embryoachsen

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt und lassen sich auf die einbezogenen Faktoren wie folgt darstellen:

Bei vollständigen Embryonen konnte festgestellt werden, daß sehr junge Embryonen (0,5 - 2,5 mm; s. Tab. 1) in in-vitro-Kulturen zu Jungpflanzen auswachsen können. Die Zahl der ausgewachsenen Embryonen nimmt während den ersten beiden Entnahmet erminen zu und sinkt danach (bei der späteren embryonalen Entwicklung) sehr rasch ab. Dies wurde bei allen drei Sorten beobachtet.

Abb. 9 zeigt insgesamt gesehen die Wachstumstendenz der unreifen Embryonen. Hier wird beobachtet, daß die Sproß- bzw. Wurzelbildung ihren Höhepunkt Anfang der zweiten Phase der Fruchtentwicklung (s. Literaturübersicht, S. 5 und Tab. 1) erreicht, danach, wenn die Embryonen ihre maximale Größe erreichen, wird eine deutliche Wachstumshemmung festgestellt.

Da die Wurzelbildung gegenüber dem Sproßwachstum anzahlmäßig während der ganzen Entwicklungszeit der Embryonen unterlag, wird vermutet, daß der Faktor der embryonalen Dormanz bzw. der Faktor der Ruhe hinsichtlich seiner hemmenden Wirkung in erster Linie die Wurzelbildung beeinflußt.

Bei sehr jungen Embryonen wirkte die Kinetinzugabe fördernd bei der Ausbildung von Sproß und Wurzel. Ohne Kinetin konnten junge Embryonen nicht zu Jungpflanzen auswachsen (s. Tab. 8).

Während der Kultur in-vitro konnten zu Jungpflanzen ausgewachsene unreife junge Embryonen im Gegensatz zu ausgewachsenen Embryonen trotz Kinetinzugabe nicht die grüne Farbe in den Kotyledonen bilden. Die aus diesen sehr jungen Embryonen hervorgehenden Pflänzchen zeigten jedoch grüne Blätter.

Sehr junge kultivierte Embryonen zeigten 1 - 3 Wochen nach Kulturbeginn nur Volumenwachstum (Abb. 10). Diese Sproß- und Wurzelhemmung in der ersten Zeit ist vermutlich durch die Wirkung des in die Nährlösung gegebenen Caseinhydrolysats entstanden. ZIEBUR et al. (1950) berichtet ähnlich bei in-vitro kultivierten unreifen Gerstenembryonen. Nach dem oben erwähnten Volumenwachstum begannen die Embryonen Sproß und Wurzel zu bilden. 4 Wochen später bildeten sich bei der Sorte Rotterts Braune 4 - 6 Blätter, die 12 - 25 mm lang und 6 - 12 mm breit waren und Wurzeln von ca. 20 - 50 mm Länge hatten (Abb. 11). Bei den Sorten Werdersche Frühe und Hedelfinger war das Sproßwachstum und die Wurzelbildung um etwa

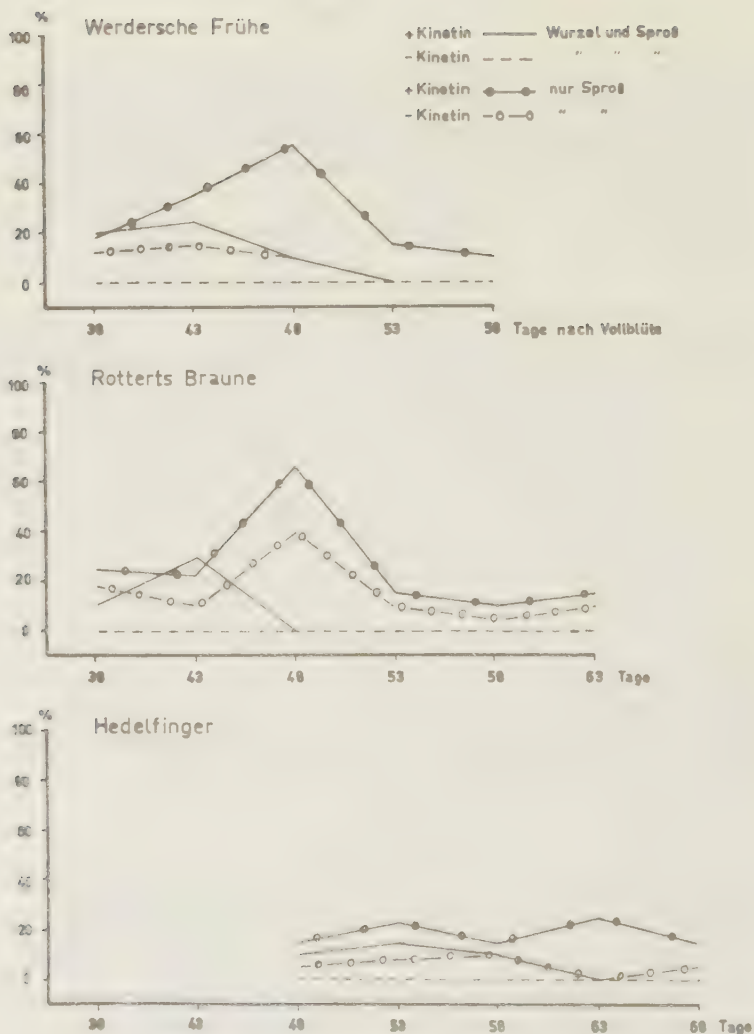


Abb. 9: Die Wachstumstendenz in-vitro kultivierter unreifer Embryonen dreier Kirschsor ten in Abhängigkeit vom Reifegrad des Embryos und Kinetinzugabe (Versuch 1968).

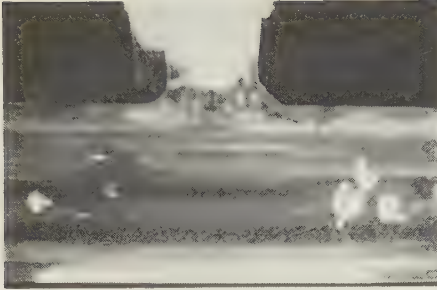


Abb. 10: Sehr junge Embryonen (48 Tage nach Vollblüte, Sorte Rotterts Braune) nach 4 Wochen Kultur in vitro. Vergleich zwischen sistierten Embryonen und Embryonen mit Volumenwachstum. Nat. Größe

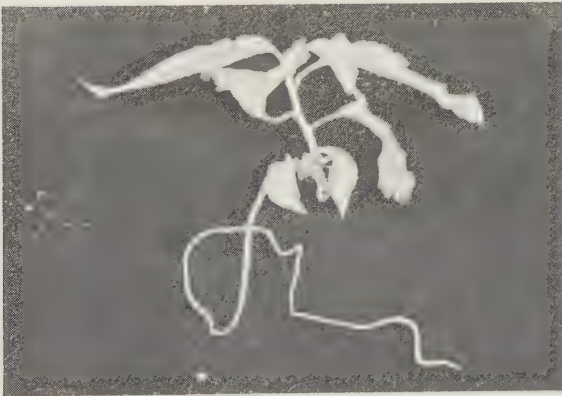


Abb. 11: Jungpflanzen aus unreifem Embryo (43 Tage nach Vollblüte, Sorte Rotterts Braune) 8 Wochen nach Kulturbeginn.



Abb. 12: Förderung der Seitenwurzel-Bildung bei einer in Wasserkultur angesetzten Jungpflanze.



Abb. 13: Normalwachsende Sämlinge aus unreifen Embryonen (38 und 43 Tage nach Vollblüte, Sorte Rotterts Braune) nach 8 Wochen in vitro, 3 Wochen Wasserkultur und 10 Wochen im Gewächshaus.

20 bzw. 50 % geringer. Die Bildung von Seitenwurzeln nach dem Abschneiden der Hauptwurzel konnte während der Wasserkultur stark gefördert werden (Abb. 12).

Die 48, aus den in-vitro-Kulturen entstandenen Pflanzen waren in ihrem Wachstum relativ schwach. Mitte August wurde während der Wasserkultur langsames Wachstum beobachtet. Hier fielen 11 Pflänzchen aus. Während der viermonatigen Kultur in Einheitserde im Gewächshaus starben weitere 6 Pflanzen. Die überlebenden Sämlinge erreichten eine durchschnittliche Größe von 140 mm, 5 mm Stammdurchmesser und trugen durchschnittlich 11 Blätter. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde kein anomales Wachstum festgestellt (Abb. 13).

Nachdem die restlichen 31 Sämlinge die Kältebehandlung erhielten, gingen 4 ein. Nach Beendigung der Kältebehandlung und dem Überführen ins Gewächshaus trieben die Knospen aus. Im Mai 1969 erreichten die Sämlinge im Freiland eine durchschnittliche Größe von 26 cm, 17 der 27 Pflanzen zeigten 1 - 2 Seitentriebe. Mißbildungen und Zwergwuchs wurden äußerlich nicht beobachtet.

Die Entfernung der Kotyledonen förderte bei allen Versuchsgliedern bei Kinetinzugabe das Sproßwachstum stark. Die Wurzelbildung bleibt jedoch gehemmt. Ohne Kinetin wurde das Sproßwachstum bei allen Sorten und bei den gegebenen Entnahmeterminen deutlich inhibiert (s. Tab. 8). Außerdem färbten sich die Blätter bei Fehlen von Kinetin nur blaßgrün.

Unter den gegebenen Kulturbedingungen begannen die Embryoachsen 2 - 5 Tage nach Kulturbeginn ohne Wurzelbildung die Primordialblätter zu entfalten. 4 Wochen später bildeten sich 2 - 4 Blätter, die 4 - 12 mm lang und 4 - 6 mm breit waren (s. Abb. 8). Bei der Sorte Hedelfinger wurde eine noch schwächere Entfaltung beobachtet. 8 - 10 Wochen nach Kulturbeginn färbten sich die Blätter blaßgrün und starben danach ab.

5.2. Variierung von Hormonen und Vitaminen in der Nährlösung

In diesem Versuch wird angestrebt, die bisher in der flüssigen Nährlösung ausgebliebene Wurzelbildung bei in-vitro kultivierten Embryoachsen zu fördern. Folgende Faktoren wurden mit einbezogen:

- a) drei Sorten fanden Verwendung und zwar Werdersche Frühe, Rotterts Braune und Hedelfinger
- b) Da die Anregung der Wurzelbildung in-vitro vermutlich in erster Linie durch Hormone und Vitamine zu regulieren ist, wurde in diesem Versuch der Einfluß dieser Parameter, ausgehend von der flüssigen Nährlösung nach NEUMANN (s. Tab. 2) durch neun Behandlungen wie folgt variiert (s. Tab. 9).

Tabelle 9

Nährlösung nach NEUMANN unter Variierung der Hormon- und Vitaminzugaben

Behandlg.	Mineralstoffe	Hormone	Vitamine
1.	+ ¹⁾	+	+
2.	+	- ²⁾	+
3.	+	1/2 Konzentr.	+
4.	+	nur IES	+
5.	+	nur Kinetin	+
6.	+	nur m-Inosit	+
7.	+	-	-
8.	+	+	-
9.	+	2 mal Konzentration	2 mal Konzentration

1) + = in die Nährlösung zugegeben

2) - = in die Nährlösung nicht zugegeben

- c) Bei allen drei Sorten wurde diese Behandlung nur bei einem Entnahmetermin, nämlich 58 Tage nach Vollblüte, durchgeführt (Die Zahl je Versuchsglied betrug 30 Embryonen bzw. Embryoachsen).

Ergebnisse:

Die Variierung der Hormon- und Vitaminlösung in dem flüssigen Nährmedium konnte bei allen Versuchsgliedern die Wurzelbildung nicht anregen. Bei der Kontrolle (Nährlösung nach NEUMANN unverändert) wurde ein sehr geringer Prozentsatz Wurzelwachstum bei Embryonen der Sorte Hedelfinger beobachtet, welche sich in einem relativ frühen Entwicklungsstadium befanden; d. h. die embryonale Dormanz war noch nicht wirksam. Dagegen konnten die ausgewachsenen Embryonen (Rotterts Braune) bzw. Embryonen in der Phase der Fruchtreife (Werdersche Frühe) (s. Tab. 1) nicht zu Jungpflanzen auswachsen (Tab. 10).

Tabelle 10

Wachstum in-vitro kultivierter, 58 Tage nach Vollblüte entnommenen Embryonen bzw. Embryoachsen dreier Süßkirschsor ten in Abhängigkeit von der Variierung der Hormon- und Vitaminlösung in dem flüssigen Nährmedium nach NEUMANN (s. Tab. 2 und 9).

Zusammensetzg. der Nährlsg.hinsichtl. Horm. u. Vitamine	Anzahl der Embry. u.E.achsen mit nur Sproßwachstum ¹⁾		Werd.Fr.		Rotterts Br.		Hedelfinger		Summe	
	E	EA	E	EA	E	EA	E	EA	E	EA
1. vollständig	3	14	3	16	5*	6	11	36		
2. ohne Hormone	0	3	1	4	3	8	4	15		
3. 1/2 Hormon	0	8	1	6	0	7	1	21		
4. nur IES	1	4	0	4	0	4	1	12		
5. nur Kinetin	5	12	3	14	2	5	10	31		
6. nur Inosit	0	2	1	3	0	4	1	9		
7. ohne Vit.u.Horm.	0	1	0	0	1	0	1	1		
8. ohne Vitamin	2	10	1	9	1	6	4	25		
9. 2x Vit.u.Horm.	0	1	0	1	1	2	1	4		
Summen	11	55	10	57	13	42	34	154		

1) gesamte Anzahl kultivierter un- oder Embryonen (E) bzw. Embryoachsen (EA) war 30

*) davon drei zu vollständigen Pflanzen ausgewachsen

Diese Ergebnisse zeigen nochmal übereinstimmend mit den vorherigen Befunden (s. 4.1 und 5.1) den Entwicklungsverlauf der embryonalen Dormanz in den Embryonen während der Fruchtentwicklung am Baum.

Die Entfernung der Kotyledonen wirkte auch hier fördernd auf das Sproßwachstum (s. 4.1 und 5.1). Die Wurzelbildung blieb immer aus. Der günstigste Einfluß auf die Sproßbildung konnte nur bei der unveränderten Nährlösung beobachtet werden. Die Variierung der Hormone und Vitaminlösung hatte nur mehr oder weniger Wirkung auf die Primordialblattentfaltung. Die Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, daß Kinetin allein ausschlaggebend für das spätere Sproßwachstum ist (s. auch Tabelle 8)

5.3. Umsetzen auf Agarnährmedien und in Einheitserde unter verschiedenen Kulturbedingungen

In diesem Abschnitt wurde versucht, bei nur blattentfalteten Embryoachsen (6 Wochen alt), die aus den Versuchen 5.1 und 5.2 hervorgehen), durch Weiterkultur auf Agarmedien bzw. in Einheitserde die Wurzelbildung zu fördern.

Für die Agarnährmedien dienten die von TUKEY und von NEUMANN angegebenen Rezepte (s. Tab. 2). Es wurden jedoch weitere folgende Änderungen vorgenommen (Tab. 11).

Tabelle 11

Verschieden zusammengesetzte Agarnährmedien für die Kulturen der blattentfalteten Embryoachsen

TUKEY		NEUMANN	
1. normal (Kontrolle)		5. normal (Kontrolle)	
2. " +Kinetin, +m-Inosit		6. ohne Kinetin	
3. " + IES, + m-Inosit		7. ohne m-Inosit	
4. " + IES		8. ohne Kinetin, m-Inosit	
		9. ohne IES	

Die den Nährlösungen 2 - 4 zugegebenen Hormone entsprachen der Konzentration, die bei der Nährlösung nach NEUMANN (s. Tab. 2) angegeben wurde.

Zusätzlich zu den nötigen Nährstoffen wurden wie üblich 0,7 % Difco-Bacto-Agar zugefügt und alle Nährlösungen auf den pH-Wert 5,5 (s. S.27) eingestellt. Die Embryoachsen mit entfalteteten Primordialblättern wurden jede für sich in ein Kulturgefäß (150 mm hoch und 25 mm Ø), gefüllt mit 30 ml Agarlösung, mit der Radikula nach unten eingesetzt. Die Kulturgefäße kamen ins Gewächshaus (s. S.28). Zweimal wöchentlich wurde unter sterilen Bedingungen destilliertes Wasser auf die Oberfläche des Mediums aufgetropft. Somit konnte das Austrocknen der Gewebe verhindert werden.

Für die Kultur in Einheitserde wurden die Embryoachsen mit nur ausgebildeten Sprossen mit der Radikula nach unten in Holzkästen, gefüllt mit Einheitserde (Typ L) unter Sprühnebelverfahren weiterkultiviert.

Weitere blattentfaltete Embryoachsen konnten in Einheitserde gesetzt und nur einmal täglich vorsichtig angefeuchtet werden.

Bei 20 % der kultivierten blattentfalteten Embryoachsen wurde die Radikula ca. 1 mm abgeschnitten, um möglicherweise "Wundhormone" hervorzurufen, die die Wurzelbildung anregen können.

d) Zahl je Versuchsglied:

- Auf Agarmedien, 20 blattentfaltete Embryoachsen
- In Einheitserde, 100 blattentfaltete Embryoachsen

Ergebnisse:

Die in der vorherigen Kultur (5.1 und 5.2) entfalteten Primordialblätter (2 - 4 Blättchen) konnten auf den variierten Agarnährmedien (s. Tab. 11) nicht weiterwachsen.

Nach 4 - 8 Wochen verloren die Gewebe allmählich ihre grüne Farbe und starben ab. Bei keiner der entfalteten Embryoachsen konnte Wurzelbildung festgestellt werden.

Die weitere Kultivierung in Einheitserde unter Sprühnebelverfahren bzw. im Gewächshaus brachte, ähnlich wie auf den Agarnährmedien, keinen Erfolg. Das Abschneiden der Radikula hatte keinen Einfluß auf die Wurzelbildung!

Da die Kultivierung der nur blattentfalteten Embryoachsen auf Agarnährmedien und in Einheitserde unter den oben genannten Kulturbedingungen kein Wurzelwachstum brachte, ist anzunehmen, daß in den entfalteten Blättchen Stoffe gebildet wurden, die auch unter besten Wachstumsbedingungen auf die spätere Wurzelbildung hemmend wirken. Betrachtet man die wurzellosen blattentfalteten Embryoachsen als "Stecklinge", so wäre es denkbar, bei weiteren Untersuchungen das Wurzelwachstum durch Behandlung mit IES-Lösungen zu fördern.

6. Wirkung von Kotyledonenreduktion und von nativen Extrakten"
auf das Wachstum ausgereifter, ruhenden
der Kirschembryonen (1968/69)

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, daß unter geeigneten Bedingungen - sich aus Embryoachsen vorwiegend nur Sproße entwickeln. Bei vollständigen Embryonen entstehen dagegen, wenn auch in wesentlich geringem Umfange, vollständige Pflanzchen mit Sproßen und Wurzeln. Hieraus kann gefolgert werden, daß einmal die Kotyledonen bzw. in ihnen gebildete Substanzen, eine wesentliche Bedeutung für das Auswachsen der Wurzeln zukommt, daß aber andererseits hierdurch auch das Auswachsen der Sproße eine Hemmung erfährt.

Ausgehend von diesen Befunden wurden im Winter 1968/69 eine Reihe von Versuchen durchgeführt mit ausgereiften, ruhenden Kirschembryonen, von denen anzunehmen war, daß sie sich wie Embryonen verhalten, die zur Fruchtreife entnommen worden sind, sich also in Dormanz befanden. Mit diesem Material sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Wie wirkt sich eine graduelle Reduktion der Kotyledonen auf die Wachstumstendenzen von Sproß und Wurzel aus?
2. Kann durch eine Zugabe von Extrakten aus nachgereiften, d. h. stratifizierten Kirschembryonen das Wachstum nicht nachgereifter ruhender Embryonen beeinflußt werden? Und welche Extrakte sind hierfür evtl. am besten geeignet?
3. Bestehen bei Embryoachsen, die aus geschrumpften und normalentwickelten Embryonen stammen, deutliche Unterschiede hinsichtlich des Wachstums?

In allen Versuchen fanden Embryonen von *Pr. avium silvestris* einer bestimmten Herkunft Verwendung, die sich im Ruhezustand befanden (s. S. 19).

6.1. Die Wirkung gradueller Kotyledonenreduktion

Nachdem die Embryonen für die Kultur vorbereitet waren, erfolgte eine graduelle Reduzierung der Kotyledonen in folgenden Stufen:

1. ohne Reduktion, ganze Embryonen, vollständige,
2. eine 25 prozentige Reduktion
3. eine 50 prozentige Reduktion
4. eine 75 prozentige Reduktion,
5. eine 100 prozentige Reduktion, bei der nur die Embryoachse zur Kultur gelangte.

Die Versuche wurden in der Nährlösung nach NEUMANN nach der Auxophytonmethode durchgeführt.

Jedes der oben angeführten Versuchsglieder umfaßte 50 embryonale Gewebe.

Ergebnisse:

Die Reduzierung der Kotyledonen wirkte unter den gegebenen Kulturbedingungen deutlich auf das Wachstum der in vitro kultivierten embryonalen Gewebe (Tab. 12). Die Kotyledonenresektion auf 75, 50 und 25 % regte das Sproß- und Wurzelwachstum an und erbrachte, der Reduzierung entsprechend, 24, 40 und 44 % Jungpflanzen. Bei den beiden Extremen (ganze Embryonen bzw. entkotyledonisiert) kam es nur zu einer mehr oder weniger schwachen Blattentfaltung. Eine Wurzelbildung konnte nicht beobachtet werden. Läßt man das normale Wachstum (Sproß und Wurzel) außeracht, so konnte mit zunehmender Kotyledonenresektion eine zunehmende Anregung des Sproßwachstums beobachtet werden. Die vollständige Entfernung der Kotyledonen erbrachte anzahlmäßig wieder nur das Sproßwachstum (Tab. 13, s. auch Versuche 4.1 und 4.2). Diese Blattentfaltung setzte relativ schnell, 2 bis 4 Tage nach Kulturbeginn ein, dagegen erst nach 8 bis 12 Tagen, sobald ein Teil der Kotyledonen an der Sproßachse belassen wurde.

Tabelle 12

Wirkung der Kotyledonen-Reduktion auf das Wachstum nicht-nachgereifter Kirschembryonen in-vitro (1968/69)

Behandlung (Reduktion der Kotyle- donen in %)	n	+	Anzahl der embryonalen Ge- webe mit Wachstum von		
			Sproß u. Wurzel	nur Sproß	ohne Wachstum
0 	50	27*	0	4	19
25 	50	12	22	10	6
50 	50	9	20	11	10
75 	50	11	12	8	19
100 =  Achse	50	6	0	36	8

* Bei reduzierten Gewebe war der Kontakt zwischen kotyledo-
narem Gewebe und dem Desinfektionsmittel besser als bei
ganzen Embryonen, daher hier die hohen Ausfälle.

n = gesamte Anzahl kultivierter embryonaler Gewebe

+ = Anzahl der ausgefallenen durch Infektion

6 bis 8 Wochen nach Kulturbegin hatten die zu Jungpflanzen
ausgewachsenen embryonalen Gewebe 4 - 6 verhältnismäßig
kräftige grüne Blätter und 12 - 26 mm lange Wurzeln mit
mehreren Seitenwurzeln. Nach 4 Monaten im Gewächshaus
zeigten 70 % jedoch Zwergwucherserscheinungen. Bei 20 %
dieser geschwächten Sämlinge traten Blattdeformationen
auf.

6.2. Die Wirkung von Extrakten aus nachgereiften Embryonen

Bei der Stratifikation der Samen wird der Ruhezustand des
Embryos aufgehoben, wodurch die Keimung eingeleitet wird
und es zum Auswachsen von Wurzel und Sproß kommt. Nach den
bisherigen Erkenntnissen wird hierbei ein Hemmfaktor abge-

baut, ein Förderungsfaktor aufgebaut oder beides zur gleichen Zeit.

Es ist daher denkbar, daß Extrakte, die man aus stratifizierten, nachgereiften Embryonen gewinnt, das Wachstum ruhender embryonaler Gewebe beeinflußt werden kann.

Hierbei erschienen besonders zwei Fragen von Bedeutung:

- Welche Arten von Extrakten besitzen einen Einfluß?
- In welcher Konzentration sind sie am wirksamsten?

Zur Klärung dieser Fragen wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt mit verschiedenen Extrakten (s.S. 29) und Konzentration bei geringer Anzahl von embryonaler Gewebe. Hierbei ergab sich eine deutliche positive Wirkung des Äthanolextraktes. Im Hauptversuch wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Äthanolextraktes bei unterschiedlicher Vorbehandlung (kalt und heiß) gearbeitet. In beiden Versuchen kamen wiederum ganze Embryonen und nur Embryoachsen in den Versuch (je Versuchseinheit 50 embryonale Gewebe).

Ergebnisse:

Bei Erprobung der erwähnten Extrakte im Vorversuch erwies sich der Äthanolextrakt (kalt) als am günstigsten für das Sproß- und Wurzelwachstum in vitro kultivierter Embryoachsen aus nicht-nachgereiften Embryonen. Die Extraktzugabe hatte dagegen bei ganzen Embryonen keinen Einfluß auf ihr weiteres Wachstum. Bei Extraktzugabe entsprechend einem nachgereiften Embryo konnte die anzahlmäßig beste Ausbildung zu Jungpflanzen festgestellt werden (Tab. 13).

Um genaue Angaben über die physiologische Wirkung der anderen Extrakte (zerquetschte Embryonen, Wasserextrakt und Preßsaft zu erhalten, sind noch weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig. Die Ergebnisse des Hauptversuchs zeigen nochmals deutlich den fördernden Einfluß des Äthanolextraktes (kalt) auf das Wachstum von Sproß und Wurzel in vitro kultivierter Embryoachsen von nicht-nachgereiften

Tabelle 13

Wachstum in-vitro kultivierter embryonaler Gewebe nicht-nachgereifter Embryonen in Abhängigkeit von Kottyledonenentfernung, Art und Konzentration der zugegebenen Extrakte (1968/69)

Extrakt	Konzentr.	1) n	2) +	aus Embryoachsen			1) n	2) +	aus Embryonen		ohne Wachst.
				Anzahl m. Sproß u. Wurzel	nur Sproß	Wachstum ohne Sproß			Wurzel	Sproß	
1. Zerquetsche Embryonen (heiß)	0*	10	0	0	7	3	10	3	0	2	5
	1	10	0	2	5	3	10	0	0	2	8
	2	10	0	0	2	8	10	3	0	2	5
2. Wasser-extrakt (heiß)	3	10	0	0	0	10	10	3	0	0	7
	0	10	0	0	10	0	10	3	0	2	5
	1	10	0	0	8	2	10	3	0	4	3
3. Preßsaft (kalt)	2	10	0	0	4	6	10	3	0	1	6
	3	10	3	0	0	7	10	0	0	0	10
	0	10	0	0	7	3	10	0	0	4	6
4. Äthanol-extrakt (kalt)	1	10	0	3	7	0	10	0	0	5	5
	2	10	0	1	3	6	10	3	0	1	6
	3	10	0	0	1	9	10	0	0	0	10
4. Äthanol-extrakt (kalt)	0	10	0	0	10	0	10	3	0	3	4
	1	10	0	7	3	0	10	3	0	6	1
	2	10	3	2	2	3	10	3	0	1	6
4. Äthanol-extrakt (kalt)	3	10	0	0	0	10	10	3	0	0	7
	0	10	0	0	10	0	10	3	0	3	4
	1	10	0	7	3	0	10	3	0	6	1
	2	10	3	2	2	3	10	3	0	1	6
	3	10	0	0	0	10	10	3	0	0	7

* Konzentration des Extraktes entsprechend der Anzahl der nachgereiften Embryonen

1) n = insgesamt kultivierte embryonale Gewebe

2) + = Anzahl der ausgefallenen durch Infektion

Kirschembryonen. Wurde der Äthanolextrakt zusammen mit der Nährlösung autoklaviert, so verlor er zum größten Teil seine Wirkung, z.B. konnten nur 8 % der mit autoklaviertem Äthanolextrakt kultivierten Embryoachsen gegenüber 82 %, wenn der Extrakt (kalt) zugegeben wird, zu Jungpflanzen auswachsen (Tab. 14).

Das Sproß- und Wurzelwachstum wurde weitgehend von der Konzentration des zugegebenen Äthanolextraktes beeinflusst. Entspricht die Menge der zugegebenen Extrakte einem Embryo, so konnte sowohl das Wurzel- als auch Sproßwachstum deutlich gefördert werden. Bei höherer Extraktzugabe (Menge entsprechend zwei Embryonen) wurde in erster Linie das Sproßwachstum und nur zum Teil die Wurzelbildung gehemmt

Entsprach die Zugabe der Menge von 3 Embryonen, so wurden Sproß- und Wurzelwachstum weitgehend inhibiert (s. Abb. 14). Unter den gegebenen Kulturbedingungen begannen die Embryoachsen 3 - 5 Tage nach Kulturbeginn zu wachsen. Hier erfolgte parallel zur Primordialblattentfaltung ein Strecken der Radikula. 7 Tage später erreichte die Radikula eine Länge bis zu 12 mm und die entfalteten Blätter 8 - 10 mm Länge (Abb. 15).

8 Wochen nach Kulturbeginn konnte im Verhältnis zu den ursprünglich kultivierten Explantaten (Embryoachsen) ein sehr starkes Wachstum beobachtet werden (Abb. 16).

Es konnten Blätter von 30 mm Länge und 16 mm Breite und Wurzeln von 170 mm Länge gemessen werden. Die Blätter, 4 - 8 pro Jungpflanze, hatten sich gut entfaltet, zeigten keine Mißbildungen und waren normal grün gefärbt. Die Wurzelbildung war groß, jedoch mit sehr wenig Seitenwurzeln. An der Hauptwurzel zeigten sich wenige Wurzelhaare. In der Wasserkultur wurde die Bildung von Seitenwurzeln durch



Abb. 14: Gehemmtes Sproßwachstum in vitro kultivierter Embryoachse durch hohe Extraktzugabe. Menge entsprechend 2 Embryonen.¹

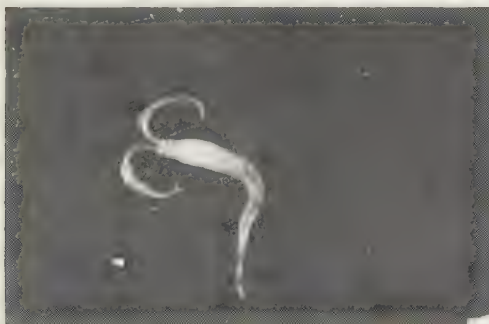


Abb. 15: In vitro kultivierte Embryoachse 1 Woche nach Kulturbeginn bei Extraktzugabe. Menge entsprechend 1 Embryo.

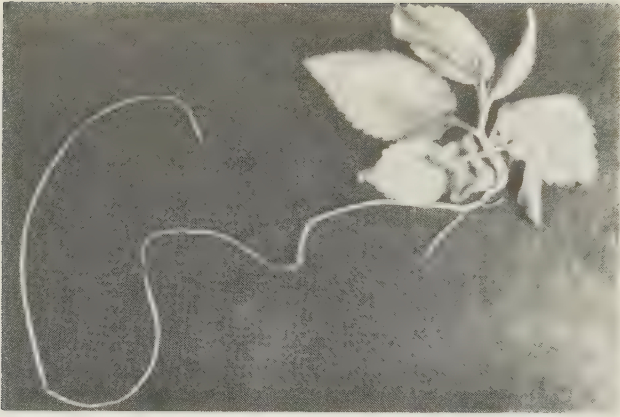


Abb. 16: Normalwachsende Kirschkpflanze aus in-vitro kultivierter Embryoachse, gefördert durch die Extraktzugabe, 8 Wochen nach Kulturbeginn



Abb. 17: Kirschsämlinge mit normalem Wachstum aus Embryoachsen von nicht-nachgereiften Embryonen nach 8 Wochen in-vitro, 4 Wochen in Wasserkultur und ca. 4 Monaten im Gewächshaus

Tabelle 14

Wachstum in-vitro kultivierter embryonaler Gewebe nicht-nachgereifter Embryonen in
Abhängigkeit von Kottyledonenentfernung, Menge und Vorbehandlung des Extraktes (1968/69)

Extrakt	Konz.	1) n	2) +	aus Embryoachsen			1) n	2) +	aus Embryonen			ohne Wachs- tum
				anzahl mit Sproß und Wurzel	nur Sproß Wurzel	Wachstum ohne Wach- tum			anzahl mit Sproß und Wurzel	nur Sproß Wurzel	nur Wurzel	
Äthanol- extrakt	0*	50	6	0	27	0	50	13	0	7	0	30
(kalt)	1	50	1	41	3	1	50	17	0	5	0	28
	2	50	4	11	7	17	50	14	0	2	0	34
	3	50	1	0	2	4	50	12	0	0	0	38
Äthanol- extrakt	0	50	3	0	24	0	50	12	0	5	0	33
(heiß)	1	50	6	4	30	0	50	12	0	6	0	23
	2	50	3	0	9	2	50	16	0	3	0	31
	3	50	3	0	4	0	50	12	0	0	0	38

* Konzentration des Extraktes entsprechend der Anzahl der nachgereiften Embryonen

1) n = insgesamt kultivierte embryonale Gewebe

2) + = Anzahl der ausgefallenen durch Infektion

Verkürzen der Hauptwurzel gefördert (s. auch Abb. 12). Wurde die Hauptwurzel nicht gekürzt, so wuchs sie weiter in die Länge, ohne Seitenwurzeln zu bilden. Für die weitere Aufzucht der Pflänzchen nach dem Versetzen in Boden ist jedoch die Bildung von Seitenwurzeln von größter Bedeutung. Im Gewächshaus zeigten die von Embryoachsen ausgewachsenen Jungpflanzen, obwohl sie relativ klein waren, normales Wachstum; Zwergwuchs oder Blattdeformationen wurden nicht beobachtet (Abb. 17).

6.3. Vergleich von Embryoachsen normal ausgebildeter und geschrumpfter Embryonen

Es wurde bei den vorliegenden Untersuchungen beobachtet, daß die Embryoachsen von geschrumpften Embryonen normal und voll ausgebildet wie aus gesunden, nicht geschrumpften Embryonen sind (s. S. 23).

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich Embryoachsen aus solchen geschrumpften Embryonen wie die aus gesunden Embryonen zu Jungpflanzen entwickeln können.

Bei der Vorbereitung der Embryonen für die Kultur wurden nach dem Knacken der Samen die trockenen Kerne einzeln gewogen. Es stellte sich heraus, daß die geschrumpften Embryonen umhüllt von Integumenten und Endosperm 40 - 60 % leichter gegenüber den normalen waren.

Zur Kultur kamen:

Embryoachsen aus geschrumpften, sowie aus normal ausgebildeten Embryonen bei Zugabe von Äthanolextrakt (kalt), Menge entsprechend einem Embryo, sowie ohne Extraktzugabe, Zahl je Versuchsglied, 50 Embryoachsen.

Ergebnisse

Die Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen entwickelten sich ähnlich wie die aus normal ausgebildeten Embryonen (Tab. 15).

Tabelle 15

Wachstum in-vitro kultivierter Embryoachsen aus nicht-nach-
gereiften Samen mit normal ausgebildeten bzw. geschrumpften
Embryonen in Abhängigkeit von Äthanolextraktzugabe (1968/69)

Äthanol- extrakt...	Embryo- achsen	1) n	2) +	Anzahl der Embryoachsen mit Wachstum von		
				Sproß u. Wurzel	nur Sproß	ohne Wachstum
0	G	50	6	0	41	3
	N	50	3	0	44	3
1	G	50	0	40	7	3
	N	50	3	<u>42</u>	2	3

* = die zugegebene Menge des Extraktes entspricht 0 bzw. 1
nachgereiftem Embryo.

** = G = Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen

N = Embryoachsen aus normal ausgebildeten Embryonen

1) n = insgesamt kultivierte Embryoachse

2) + = Anzahl der Ausgefallenen durch Infektion

Bei Zugabe von Äthanolextrakt (kalt) und bei einer Menge
entsprechend 1 Embryo konnten 80 % der Embryoachsen aus ge-
schrumpften und 84 % aus normalen Embryonen zu Jungpflanzen
auswachsen. Sie entwickelten sich in Wasserkultur und danach
in Einheitserde im Gewächshaus ohne bedeutende Wachstums-
unterschiede weiter. Ohne Extraktzugabe konnte bei allen
Embryoachsen nur Blättentfaltung ohne Wurzelbildung be-
obachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, daß die
Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen, die 40 - 60 %
leichter wogen als normale, in der Lage sind, sich genauso
wie die Embryoachsen aus normal ausgewachsenen Embryonen
zu Jungpflanzen zu entwickeln (s. Tab. 15).

7. Wirkung von Äthanolextraktzugabe und Kotyledonen-
reduktion auf das Wachstum u n r e i f e r Kirsch-
embryonen (1969)

In der Versuchsreihe des Winters 1968/69 konnte durch Zugabe von kalt hergestellten Äthanolextrakten aus stratifizierten Kirschembryonen in bestimmter Konzentration und durch eine Reduktion der Kotyledonen ein vollständiges Wachstum (sowohl Sproß- als auch Wurzelbildung) von Embryoachsen ausge-reifter, ruhender Embryonen bei einem großen Prozentsatz bewirkt werden.

Die im Frühsommer des folgenden Jahres vorgenommenen Versuche sollten die Frage klären, ob ähnliche Wirkungen auch bei u n r e i f e n , während der Fruchtreife entnommenen Embryonen auftreten.

Hierzu diente wieder die Sorte Rotterts Braune, bei der eine Entnahme der Früchte im Abstand von 5 Tagen, (beginnend mit 36 Tagen, also 36, 41, 46, 51, 56 und 61 Tage nach Vollblüte) erfolgte.

Vom Entnahmetermin 46 Tage nach Vollblüte an wurden die Embryonen wieder einer Reduktion der Kotyledonen unterzogen sodaß drei Behandlungen vorlagen; ohne Reduktion, 50 prozentige Reduktion und vollständige Reduktion (= Embryo-achse).

Weiterhin wurde in dem Versuch die Zugabe von kalt hergestellten Äthanolextrakten in drei Konzentrationen, entsprechend 0,1 und 2 Embryonen, einbezogen.

Am letzten Entnahmetermin erfolgte außerdem ein Vergleich des Wachstums von Embryoachsen aus normalen und geschrumpften Embryonen unter Zugabe von Äthanolextrakt (entsprechend 1 Embryo).

Die in-vitro-Kultur erfolgte in der Nährlösung nach NEU-MANN und der Auxophytonmethode. Die Weiterbehandlung der Sämlinge erfolgte über eine Wasserkultur und Topfkultur in Einheitserde im Gewächshaus.

Außerdem ergab sich die Möglichkeit, aus dem Züchtungsprogramm des Instituts (SCHMIDT 1969) Embryonen von der Sorte Schattenmorelle x Kassins Frühe, die 68 Tage nach Vollblüte geerntet waren, nach der Standardmethode (50 und 100-prozentige Kotyledonenreduktion und Zugabe von Äthanolextrakt entspr. 1 Embryo) zu kultivieren.

Ergebnisse

Ähnlich wie im Winterversuch 1968/69 zeigte der Äthanol-extrakt aus nachgereiften Embryonen auch hier bei den in-vitro kultivierten embryonalen Geweben von unreifen Embryonen der Süßkirschsorte Rotterts Braune seine günstige Wirkung auf das Sproß- und Wurzelwachstum. Die Embryoachsen konnten unter den gegebenen Kulturbedingungen ohne Extraktzugabe mit Ausnahme von 2 Fällen nur Sprosse ausbilden (Tab. 16). Die Primordialblätter begannen sich 3 - 5 Tage nach Kulturbeginn, meistens ohne oder mit kurzer Hypokotyl- bzw. Epikotylstreckung zu entfalten. Bei diesen blattentfalteten Embryoachsen konnte bis zu 10 Wochen nach Kulturbeginn keine Wurzelbildung beobachtet werden.

Auch das Umsetzen in frische Nährlösung regte das Wachstum nicht an. Bei den sehr jung kultivierten Embryonen (36 und 41 Tage nach Vollblüte) fand in der 1. bis 3. Woche nach Kulturbeginn nur Volumenwachstum statt. Innerhalb dieser Zeit vergrößerte sich das Volumen der Embryonen um das 4 - 8-fache (s. auch Abb. 10). Erst danach begannen die Embryonen Sproß- und Wurzel auszubilden. Die Extraktzugabe zeigte einen fördernden Einfluß auf Sproß- und Wurzelbildung sehr jung kultivierter Embryonen. Je nach Konzentration des Extraktes konnten 40 - 70 % dieser Embryonen nach der Volumenzunahme zu Jungpflanzen auswachsen (Abb. 18, s. Tab. 16).

Tabelle 16

Wirkung von Kotyledonenreduktion und Zugabe von Äthanol-
extrakt aus nachgereiften Kiischembryonen auf die Anzahl
vollständig ausgewachsener Pflanzen in-vitro bzw. im Ge-
wächshaus (Sorte Rotterts Braune 1969)

Behandlung		Anzahl		vollständig ausgewachsener				
Kotyl. Red.	Extr. + Zug.	T ¹⁾ n ²⁾	Pflanzen		in-vitro			
			36	41	46	51	56	61
			40	40	20	20	20	20
0 % ⊖	0		10	21	1	0	0	0
	1		18	20	2	0	1	0
	2		3	6	0	0	0	0
50 % ⊖	0		-	-	6	4	3	1
	1		-	-	5	6	4	3
	2		-	-	2	0	0	0
100 % -	0		-	-	0	2	0	0
	1		-	-	12	16	13	12
	2		-	-	0	0	0	0
im Gewächshaus am 1. Oktober								
0 % ⊖	0		6	14	0	0	0	0
	1		11	17	0	0	0	0
	2		0	2	0	0	0	0
50 % ⊖	0		-	-	5	4	2	1
	1		-	-	5	5	4	2
	2		-	-	1	0	0	0
100 % -	0		-	-	0	1	0	0
	1		-	-	9	13	10	9
	2		-	-	0	0	0	0

⁺Die zugegebenen Mengen des Extraktes entsprechen 0 = keine Extraktzugabe, 1 = ein nachgereifter Embryo, 2 = zwei nachgereifte Embryonen

1) T = Termine der Entnahme der Embryonen in Tagen nach Vollblüte

2) n = Anzahl der kultivierten Embryonen je Versuchseinheit

Unter den gegebenen Kulturbedingungen lassen die Ergebnisse erkennen, daß die Embryonen 46 Tage nach Vollblüte in ihre Ruheperiode eintraten. Bei diesen in die Ruheperiode eingetretenen Embryonen konnte auch durch die Extraktzugabe die Wurzelbildung nicht angeregt werden. Bei der vereinzelt auftretenden Primordialblattentfaltung blieb das weitere Sproßwachstum weitgehend gehemmt.

Bei 46 Tage alten Embryonen konnte die Kotyledonenresektion auf 50 % den prozentualen Anteil der ausgewachsenen Jungpflanzen steigern. Dies nimmt bei den folgenden Probeentnahmen und zugleich mit zunehmendem Embryoalter (während der Fruchtentwicklung am Baum) kontinuierlich ab (Abb. 19).

Die kultivierten Embryoachsen konnten bei Extraktzugabe normales Sproß- und Wurzelwachstum vorweisen. Bei Extraktzugabe, Menge entsprechend 1 Embryo, entwickelten sich 60 - 80 % der kultivierten Embryoachsen zu Jungpflanzen (Abb. 20, S. Tab. 16).

Bei höherer Extraktzugabe (Menge entsprechend 2 Embryonen) blieb das Sproßwachstum gehemmt. 20 - 40 % der entkotyledonisierten Embryonen zeigten bei dieser Extraktzugabe nur Wurzelbildung.

Die Extraktzugabe hatte keinen Einfluß auf das Sproß- und Wurzelwachstum der reduzierten Embryonen sowie auf die weitere Entwicklung der aus ihnen hervorgehenden Sämlinge. Dagegen konnte die Extraktzugabe zu sehr jung kultivierten Embryonen die Zahl der ausgewachsenen Jungpflanzen erhöhen, jedoch das weitere Sämlingswachstum nicht fördern. Diese Sämlinge zeigen im Gegensatz zu denen aus Embryoachsen und reduzierten Embryonen das schwächste Wachstum. Obwohl das Sproß- und Wurzelwachstum der reduzierten Embryonen in-vitro und in Wasserkultur stärker als das der Embryonen war, konnte bei der späteren Sämlingsentwicklung fast kein Unterschied gefunden werden.

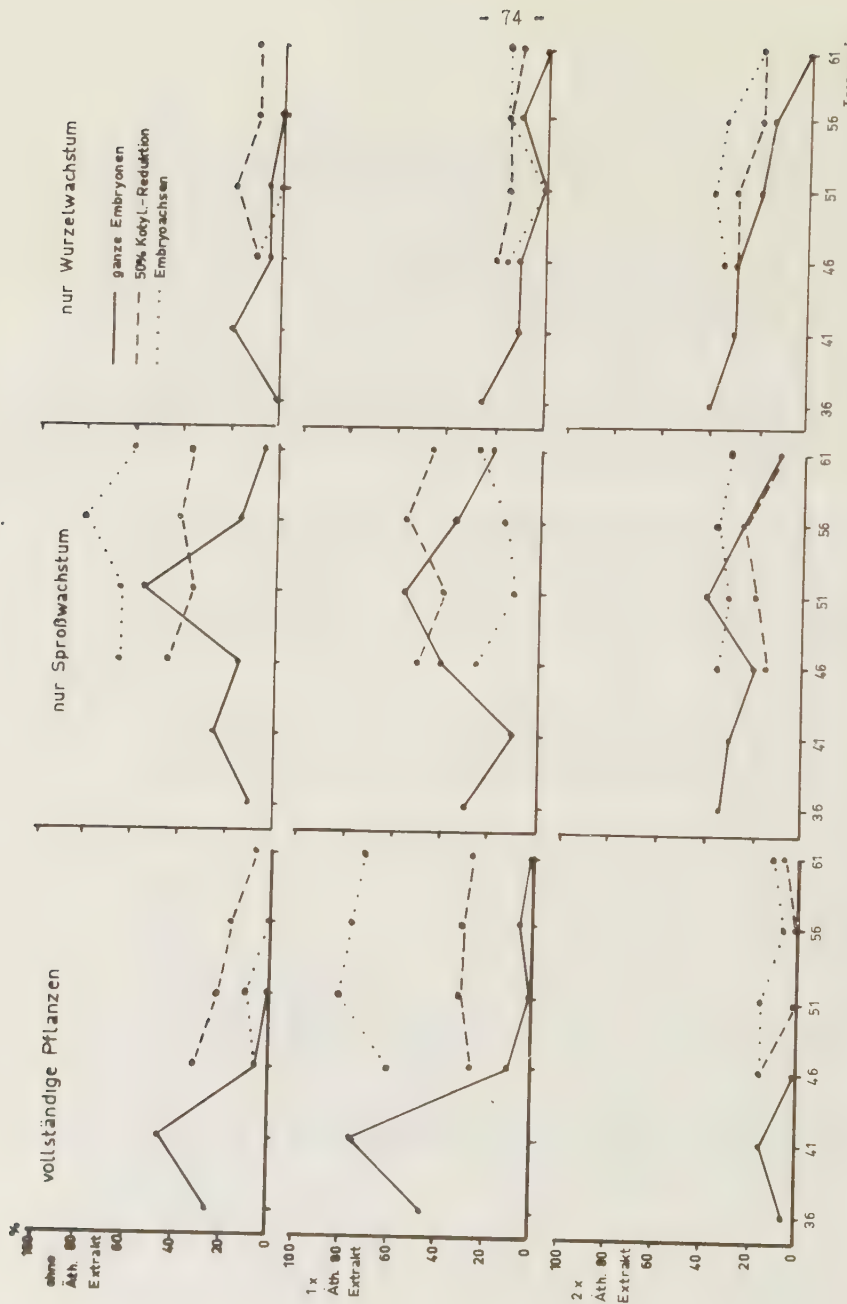


Abb. 19: Wachstum unreifer Kirschembryonen in-vitro in Abhängigkeit von dem Reifegrad des Embryos, der Kötyledonenresektion und Extraktzugabe bei der Sorte "Rotterts Braune" 1969

Die 30 Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen konnten sich unter den erwähnten Kulturbedingungen ähnlich wie die 30 Embryoachsen aus normalen Embryonen entwickeln (22 bzw. 24 entwickelten sich zur Jungpflanzen).

Die Sämlinge, die aus sehr jungen Embryonen (36 und 41 Tage nach Vollblüte) und aus Embryoachsen von unreifen Embryonen (46, 51, 56 und 61 Tage nach Vollblüte) zeigen in ihrer späteren Entwicklung im Gewächshaus normales Wachstum. Zwergwuchs oder Blattdeformationen traten nicht auf (s. auch Abb. 17). 40 % der Jungpflanzen aus unreifen Embryonen mit reduzierten Kotyledonen zeigten Zwergwucherscheinungen, jedoch keine Blattmißbildungen. Alle diese geschwächten Sämlinge gingen aus den letzten beiden Probeentnahmen (56 und 61 Tage nach Vollblüte) hervor.

Von den 22 kultivierten Embryoachsen aus den Samen der Kreuzung Schattenmorelle x Kassins Frühe entwickelten sich unter den gegebenen Kulturbedingungen 19 zu Jungpflanzen. Vier Wochen nach Kulturbeginn hatten sich durchschnittlich 5 normal entfaltete Blätter und Wurzeln von 60 mm Länge gebildet (s. auch Abb. 20). In der Wasser- und Erdkultur gingen 7 dieser Jungpflanzen ein. Bis Anfang Oktober zeigten alle Sämlinge normales Wachstum. Von den 11 kultivierten Embryonen mit reduzierten Kotyledonen sind 8 zu Jungpflanzen ausgewachsen. Davon blieben bis Anfang Oktober nur 5 Sämlinge am Leben. Die Jungpflanzen aus Embryonen mit reduzierten Kotyledonen konnten während der Kultur in-vitro, der Wasser- und Erdkultur ein kräftigeres Wachstum als die aus entkotedonisierten Embryonen vorweisen, 2 dieser Sämlinge zeigten jedoch Zwergwuchs.

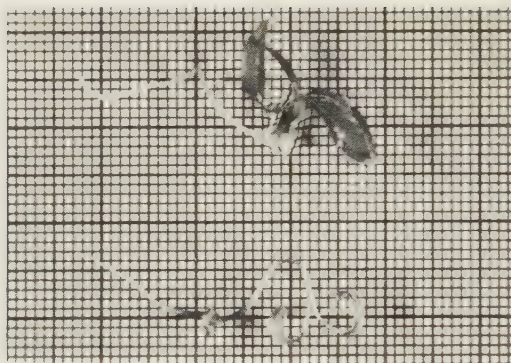


Abb. 18: Jungpflanzen aus sehr jungen unreifen Embryonen (36 Tage nach Vollblüte) nach 3 Wochen Kultur in vitro.

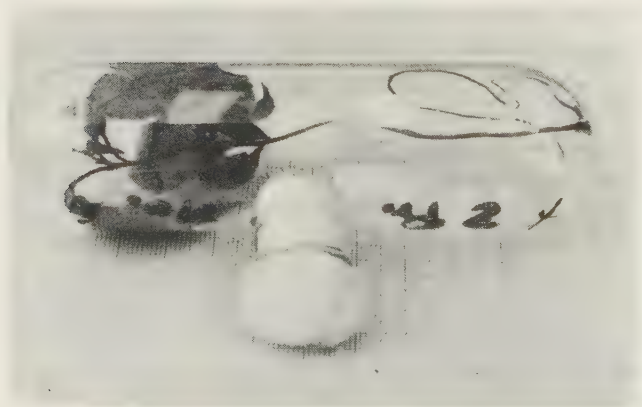


Abb. 20: Gut entwickelte Jungpflanze aus einer nach der Auxophytonmethode kultivierten Embryoachse in einem speziellem Kulturgefäß 8 Wochen nach Kulturbeginn

Diskussion

Unreife Kirschembryonen benötigen, wie es bei ausgereiften Kirschsamen erforderlich ist, eine Behandlung mit niedriger Temperatur, um die embryonale Dormanz zu überwinden. Die Kältebehandlung stimuliert das Wachstum der in-vitro kultivierten unreifen Embryonen bei allen gegebenen Entwicklungsstadien und schaltete zugleich in der weiteren Sämlingsentwicklung die Wachstumsstockung aus (s. Tab. 3, 4, 5 und 6). Die vorliegenden Ergebnisse sind eine Bestätigung für die Befunde von ZAGAJA (1959, 61b, 62 b und 64) bei einigen Stein- und Kernobstarten, sowie LESLEY und BONNER (1952) bei frühreifenden Pfirsichsorten. Dagegen berichtet PUKEY (1933a), daß eine Kältebehandlung bei der Embryokultur von unreifen Kirschembryonen erst 40 - 50 Tage nach Vollblüte zweckmäßig wäre. LAMMERTS (1942) und KRAPP und THEILER (1968) erhielten ebenfalls Steinobstsämlinge durch Embryokultur, ohne sie kalt zu behandeln.

Bei Betrachtung der Tabellen 3, 8 und 16, sowie den Abbildungen 4, 9 und 19, ist zu erkennen, daß jüngere Embryonen (36 - 48 Tage nach Vollblüte) in-vitro bei normaler Temperatur zu Jungpflanzen auswachsen können. Der Prozentsatz erreicht 46 - 58 Tage nach Vollblüte ein Maximum und sinkt danach sehr bald ab. (s. Abb.4). Es wird vermutet, daß die Ursache dieses Rückganges die Entstehung eines bestimmten Hemmfaktors bzw. Hemmmechanismus ist, der die embryonale Dormanz verursacht.

Die Wachstumshemmung der Kirschembryonen kann unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht auf Stoffe, welche sich in der, aus den Integumenten hervorgegangenen Samenschale befinden, zurückgeführt werden, da bei den vorliegenden Untersuchungen diese immer entfernt wurden. Der Hemmmechanismus kann nur in den embryonalen Gewebe selbst gefunden werden. Im Gegensatz hierzu ist bei Apfel die Samenschale für die Dormanz wenigstens teilweise verantwortlich, wie COME (1967) und VISSER (1954, 56a und 56b) beobachteten.

Die embryonale Dormanz kann mit Hilfe der Embryokultur durch frühe Entnahme der Embryonen aus der Frucht (s. Versuch 5.1 5,2 und 7) umgangen oder bei späteren Entnahmeterminen durch die Behandlung der Embryonen in-vitro mit niedriger Temperatur (s. Versuch 4.1) gebrochen oder abgebaut werden.

Die Kältebehandlung der Embryonen verbesserte zwar die Zahl der ausgewachsenen Jungpflanzen, erschien jedoch durch die hohen Ausfälle die in der weiteren Kultur entstehen, als unvorteilhaft. Es wurde daher bei den weiteren Untersuchungen angestrebt, normalwachsende Sämlinge aus Embryonenkultur ohne Zeitverlust und die damit verbundenen Ausfälle, d.h. ohne Kältebehandlung zu gewinnen.

Die Ergebnisse in Tab. 7 zeigen deutlich die fördernden Einflüsse der Kotyledonenentfernung auf das Sproßwachstum. Die Blattentfaltung, die nach Kulturbeginn sehr schnell einsetzte, deutet auf die Aufhebung der embryonalen Dormanz, aber nur bei Sproßen.

Nachdem die Weiterkultur der nur blattentfalteten Embryoachsen auf Agar- und in Erdkultur (Versuch 4.2) sowie durch die Variierung der Hormon- und Vitaminzugabe in der Nährlösung (Versuch 5.2), Wurzelbildung zu erzielen, gescheitert war, konnte angenommen werden, daß der fördernde Faktor für das Wurzelwachstum in den vorher entfernten Kotyledonen zu suchen war.

Die Ergebnisse der Versuche 6.1 und 7 zeigen, daß eine teilweise Kotyledonenresektion nicht nur bei ausgereiften, nicht stratifizierten, sondern auch bei unreifen Kirschembryonen zu den Faktoren gezählt werden kann, die die embryonale Dormanz zu brechen vermögen. Die Kotyledonenreduzierung kann aber die natürliche Nachreife nicht ganz ersetzen, da in der weiteren Entwicklung der Sämlinge anomales Wachstum auftritt.

Diese Wachstumsabnormitäten müssen jedoch nach zwei morphologisch verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden, nämlich geschwächtes Wachstum durch Zwergwuchs und Minderwuchs durch Blattmißbildungen. WANG und BEARDOW (1968) berichten ähnlich bei Pfirsichsämlingen, daß Zwergwuchs und Blattdeformationen voneinander unabhängig sind und daß Blattmißbildungen weder Folge noch Ursache des Zwergwuchses sind. Bei eigenen Keimversuchen mit Kirschsamen (nicht veröffentlicht) zeigt die Sorte Hedelfinger trotz normaler Stratifikation der Samen Blattmißbildungen bei dem späteren Sämlingswachstum. Es wird deshalb vermutet, daß die Blattdeformation sortentypisch bzw. genetisch bedingt ist, zumal bei dieser Sorte bei relativ hoher Prozentsatz "genetischer Zwerge" auftritt. Diese Beobachtungen konnten auch bei Pfirsich festgestellt werden (WANG und BEARDOW l.o.). FLEMION u.a. (1934 - 1967) erzeugten künstlich physiologisch geschwächte Sämlinge mit morphologischen Mißbildungen aus nicht-nachgereiften Pfirsichembryonen und konnten bei ihren morphologischen, histologischen und anatomischen Untersuchungen Unterschiede zwischen geschwächten Sämlingen mit Zwergwuchs und deformiertem Gewebe feststellen.

Es ging bei den weiteren Untersuchungen darum, bei der Kultur von Embryoachsen das bisher ausgebliebene Wurzelwachstum zu fördern. Die Wurzelbildung konnte, wie die Ergebnisse der Versuche 6.2, 6.3 und 7 zeigten, durch die Zugabe von Äthanol-extrakt aus nachgereiften (15 Wochen stratifiziert) Kirschembryonen ausgelöst werden. Dieser Faktor scheint hitzelabil zu sein, da durch Autoklavieren in der Nährlösung seine fördernde Wirkung auf das Auswachsen der Radikula deutlich reduziert wird. FLEMION und PROBER (1960) erkannten in ihren Untersuchungen, daß Aceton-Äthanol-extrakt aus nachgereiften bzw. nicht stratifizierten Pfirsichembryonen das Wachstum von in-vitro kultivierten entkyledonisierten Pfirsichembryonen nicht verbesserte. Da der zugegebene Extrakt mit der Agarnähr-lösung jedoch autoklaviert wurde (20 Minuten bei Druck von 15 Lb) könnte die Ursache für die Unwirksamkeit in der Zer-störung der hitzelabilen Komponente zu suchen sein.

FLEMION und PROBER (1.o.) konnten durch die Entfernung der Kotyledonen, die leider in ihrer Methodik nicht näher beschrieben wird, auf Agarnährlösung unter sterilen Bedingungen Jungpflanzen entwickeln. Sie berichten jedoch, daß das Wachstum entkotyledonisierter Embryonen aus nicht-nachgereiften Samen, langsamer und unregelmäßiger als aus stratifizierten verläuft. KESTER (1953) stellte Untersuchungen mit keimblattlosen Embryonen von Pfirsichen an. Er berichtete über ein nur unbedeutendes kurzfristiges Wachstum der Embryoachsen in-vitro. Wie aus den Ergebnissen des Versuchs 4.1 hervorgeht, konnten geschrumpfte Embryonen in-vitro nicht zu Jungpflanzen auswachsen. Es wird vermutet, daß durch die Reduzierung der Zellschichten der kotyledonaren Gewebe geschrumpfter Embryonen die Leitbündel in ihrer Funktion gestört sind, sodaß der Nährstofftransport auch unter günstigen Wachstumsbedingungen von den parenchymatischen (Kotyledonen) zu den meristematischen (Embryoachsen) Gewebe zum Teil oder völlig unterbrochen wird. Wie in den vorliegenden Untersuchungen (s. S.23) beobachtet und auch von STÖSSER (1966) festgestellt wurde, bleiben die Embryoachsen jedoch auch bei weit fortgeschrittenem Schrumpfungsprozeß lange Zeit von diesem verschont. Dies könnte so erklärt werden: Durch die möglicherweise in dem meristematischen und dagegen nicht in den parenchymatischen Geweben des Embryos enthaltenen Kinine bzw. Cytokinine wären die Embryoachsen als "mobilisierende Zentren" zu betrachten. Dieses Phänomen wurde von mehreren Autoren erwähnt (MÜLLER und LEOPOLD 1966, MOTHES, ENGELBRECHT und KULAJEWA 1959).

Die vorliegenden Versuchsergebnisse (s. Versuch 6.4 und 7.1) zeigen weiter, daß das Wachstum der kultivierten Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen (sowohl ausgereiften, nicht-stratifizierten als auch unreifen) ähnlich wie das der Embryoachsen aus normalen Embryonen verläuft. Dort, wo mit der Embryokultur die weitere Entwicklung solcher unreifen Embryonen (geschrumpfte) ermöglicht werden soll, deren natürliches Wachstum durch Abortion vorzeitig beendet wird, entscheidet der Zeitpunkt des Herauspräparierens über den

Erfolg. Die Erfolgsaussichten erhöhen sich nicht durch eine frühzeitige Isolation, denn die Kulturmethoden für Proembryonen sind leider noch nicht so weit entwickelt, um mit ihnen sicher arbeiten zu können (RAGHAVAN und TORRY (1963) und JOHRI und SINGH BAJAJA 1965). Es sollte daher versucht werden, den Embryo möglichst lange unter seinen natürlichen Bedingungen zu belassen, ihn aber noch rechtzeitig vor dem Übergreifen des Schrumpfungsprozesses auf die meristematischen Gewebe der Embryoachse zu exstirpieren und die Embryoachse zu kultivieren.

Die Tatsache, daß die Wachstumsstörungen der Embryonen während der Fruchtentwicklung nicht nur bei den Frühsorten, sondern auch bei Spätsorten auftreten können, zeigten auch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bei der Spätsorte Hedelfinger (s. S. 25 und Tab. 1). Ähnliches konnte von STÖSSER (1966) bei Süßkirschen und von BRINGEZU (1967) bei Sauerkirschen festgestellt werden.

Deshalb soll hier betont werden, daß die Anwendung der Embryokultur in der Obstzüchtung nicht nur bei Fortpflanzung der frühreifenden Sorten, wie oft in der Literatur erwähnt wird, sondern auch für die Mittel- und Spätsorten von großer Bedeutung ist.

Hinsichtlich der Beurteilung der verwendeten Techniken und Methoden bietet die Kultur in flüssiger Nährlösung und die Durchführung nach der Auxophytonmethode eine günstige Voraussetzung für das schnelle Auswachsen der Embryoachsen (s. Versuch 6.2 und 7). Während sich hier bereits nach 3 - 5 Tagen Sproß- und Wurzelwachstum einstellten, konnten FLEMION und PROBER (1960) bei entkyledonisierten Pfirschembryonen auf Agarnährmedium Wachstum erst nach 10 - 20 Tagen beobachten. Wie aus dem Versuch 4.2 hervorgeht, konnten z.B. Embryoachsen auf dem Agarnährmedium keinerlei Sproßwachstum vorweisen, bei derselben Nährlösung in flüssige Form nach der Auxophytonmethode kam die Sproßbildung jedoch zustande.

Das geringere Wachstum der sehr jungen Embryonen (aus den beiden ersten Entnahmeterminen) bei normaler Temperatur auf Agarnährmedium im Vergleich zur Kultur in flüssiger Nährlösung (Vergleiche die Ergebnisse von 4.1 mit 5.1 und 7), könnte auf das noch nicht voll leistungsfähige Leitsystem der embryonalen Gewebe, Anhäufung von ausgeschiedenen toxischen Stoffen in unmittelbarer Nähe der embryonalen Gewebe oder auf Sauerstoffmangel einzeln oder zusammen zurückzuführen sein. Die Kultivierung in flüssiger Nährlösung nach der Auxophytonmethode stellt durch die ständige Drehung der Kulturgefäße einen engen Kontakt zwischen den embryonalen Geweben bzw. dem später austreibenden Blättern und der Nährlösung her, der die Funktion des noch nicht voll ausgebildeten Leitsystems ergänzt. Weitere Vorteile könnten die durch die ständige Bewegung der Nährlösungen entstehende gute Belüftung und Verhinderung einer möglichen Anhäufung ausgeschiedener toxischer Stoffe sein.

Da die Bildung von Seitenwurzeln nach dem Abschneiden der Hauptwurzel während der Wasserkultur stark gefördert war, (s. S. 53), und die Jungpflanzen durch die neue Umgebung etwas abgehärtet wurden, stellte die Wasserkultur einen guten Übergang zur Erdkultur her.

Weil der Schwerpunkt der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit in erster Linie auf der Kultur in-vitro lag, wurde der Verbesserung der Weiterkultur der Sämlinge in-vivowenig Aufmerksamkeit geschenkt. Der Pflanzenzüchter ist aber an gesundem, relativ schnellem Sämlingswachstum interessiert. Daher sollen bei weiteren Untersuchungen in-vivo Lösungen gegen Ausfälle, durch Mikroorganismen während der Kultur in Erde und durch das Auftreten von Wachstumsanomalien gefunden werden. Die Wachstumsabnormitäten dürften jedoch im Vordergrund bei den weiteren Untersuchungen stehen, da durch sie das Sämlingswachstum erheblich geschwächt wird.

Trotz der interessanten Ergebnisse, hinsichtlich der Aufklärung des Prozesses der Nachreife, die in der Literaturübersicht (s. S. 15 - 17) angeführt werden, konnte kaum eine gesicherte bzw. direkte Beziehung zwischen einem bestimmten Befund und der Aufhebung der Wachstumshemmung durch die Nachreife gefunden werden.

In den Versuchen 6.2, 6.3 und 7 konnte mit Erfolg durch die Kultur der Embryoachse in-vitro näheres über die Wirkung mehrerer, in der Nährlösung zugesetzter Hormone bzw. nativer Extrakte auf das Wachstum untersucht werden. Diese Kultur mit Embryoachsen zeigte im Gegensatz zu der Kultur mit vollständigen Embryonen eine außerordentliche sensible Wachstumsreaktion bei sämtlichen Änderungen in der Nährlösung. Die biologischen Prüfungen mit Hilfe der blattlosen Embryonen müssen deshalb als hoch qualifizierter "Embryoachsen-Test" angesehen werden.

Würden bei weiteren Untersuchungen Wuchs- und Hemmstoffe aus embryonalem Gewebe isoliert, so könnte mit Hilfe des "Embryoachsen-Tests" bei der Aufklärung des Nachreifeprozesses ein Zusammenhang zwischen den geprüften Stoffen und dem Prozeß der Nachreife näher erkannt werden, da jede Prüfung praktisch auf das eigene Objekt erfolgen kann. D.h. isolierte Stoffe aus Kirschembryonen werden biologisch auf Embryoachsen von Kirschen getestet, Pfirsich auf Pfirsich usw.

Um mehr über den wachstumsfördernden Faktor bei dem schon erwähnten Äthanolextrakt (s. Versuch 6.2 und 7) zu erfahren, soll nun dieser Extrakt bei weiteren Untersuchungen fraktioniert und die verschiedenen Fraktionen nach dem "Embryoachsen-Test" biologisch untersucht werden.

Das Verzichten auf die Verwendung von nativen Extrakten kann, um das Wurzel- und Sproßwachstum in-vitro zu fördern, primär durch hormonelle Steuerung ermöglicht werden.

Dies kann evt. durch Gibberelline (über die Bedeutung der endogenen Gibberelline bei der Aufhebung der Ruheperiode der Samen berichten FRANKLAND und WAREING, 1962; PROCTOR und DENNIS, 1968 und WAREING 1969) bzw. durch IES (MIMAUT 1957) oder durch andere Hormone erreicht werden.

Mehrere Autoren berichten über die Rolle der natürlichen Hemmstoffe wie Abscisin sowie andere bei der Dormanz im Samen (WAREING 1965 und PIENIAZEK und GROCHOWSKA 1967 o.a.). Nun wird bei weiteren Untersuchungen mit Hilfe des "Embryachsen-Tests" leichter aufzuklären sein, ob die Hemmstoffe direkt das Wachstum inhibiert oder indirekt durch ihren blockierenden Einfluß auf die anderen vorhandenen Wachstumsstoffe wirkt.

In weiteren Untersuchungen wäre es wünschenswert, die Kotyledonenreduktion bei Kirschen in verschiedenen Zeitpunkten nach Kulturbeginn, wie auch bereits von GOME und THEVENOT (1968) bei Apfel durchgeführt wurde, so konnte mehr über die Mobilisierung, Transport und Bestimmungsort der fördernden und hemmenden Stoffe in den Kotyledonengewebe erfahren werden. Ebenso wünschenswert wäre es, ähnliche Untersuchungen wie BAIN und MERCER (1966a, 66b und 66c) über die subcelluläre Organisation während der Entwicklung der Kotyledonen bzw. über die Beziehung zwischen Embryachse und Kotyledonen bei keimenden Samen und Sämlingen von *Pisum sativum* auch bei Kirschen durchzuführen.

9. Zusammenfassung

Es wurden Embryokultur-Versuche bei Kirschen durchgeführt, wobei zunächst die Wirkung von drei, in ihren Zusammensetzungen sehr unterschiedlichen Agarnährmedien (TUKEY, WHITE, NEUMANN), sowie Nachprüfung einer Kältebehandlung auf das Wachstum in-vitro kultivierter unreifer Embryonen verschiedener Arten untersucht wurde.

Versuche mit entkötyledonisierten unreifen Embryonen unter verschiedenen Kulturbedingungen kamen zur Verwendung, wobei die Auxophytonmethode und die Variierung der flüssigen Nährlösung erprobt wurde.

Weitere Versuche mit ausgereiften, nicht stratifizierten Embryonen (*Pr. avium*), deren Kötyledonen verschieden reduziert (75 %, 50 %, 25 %, 100 % reduziert) wurden, erfolgten. Weiter konnte der Einfluß der Zugabe von nativen Extrakten (aus nachgereiften Kirschembryonen) auf das Wachstum in-vitro kultivierter embryonaler Gewebe beobachtet werden. Das Wachstum normaler und geschrumpfter Embryonen sowie die Entwicklung ihrer Embryoachsen wurden in-vitro verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen.

1. Während der Kultur in-vitro kann die Behandlung mit niedriger Temperatur im Gegensatz zu ohne Behandlung das Wachstum kultivierter unreifer Kirschembryonen in jedem Entwicklungsstadium stimulieren, die Embryodormanz bei ruhenden Embryonen aufheben, und das spätere Sämlingswachstum in-vivo normalisieren. Die noch nicht vermeidbaren hohen Ausfälle, in der weiteren Kultur der Sämlinge lassen diese Methode unvorteilhaft erscheinen.

2. Junge unreife Embryonen können in in-vitro-Kultur bei normaler Temperatur gegen Anfang der 2. Phase der Fruchtentwicklung (je nach Sorte 36 - 48 Tage nach Vollblüte) zu Jungpflanzen auswachsen. Die Wachstumsrate nimmt all-

mählich zu, erreicht ihren Höhepunkt vor Ende der zweiten Phase (46 - 58 Tage nach Vollblüte), danach sinkt sie rapid ab, da solche Embryonen in den Ruhezustand eintreten. Diese Tendenz konnte bei allen verwendeten Sorten und Arten in den drei Versuchsjahren beobachtet werden.

3. Kotyledonenresektion der Kirschembryonen kann deren Wachstum fördern. Mit zunehmender Reduzierung der kotyledonaren Gewebe konnte eine Zunahme der Wachstumsförderung von Plumula und Radikula beobachtet werden. Die Entfernung der Kotyledonen fördert das Sproßwachstum, hemmt jedoch immer die Wurzelbildung.

4. Kinetinzugabe zur flüssigen Nährlösung regt das Sproß- und Wurzelwachstum unreifer embryonaler Gewebe an, fördert die Bildung von Chlorophyll in den Kotyledonen und Blättern. Die Variierung der Hormon- und Vitaminzugaben in der flüssigen Nährlösung konnte die Wurzelbildung der in-vitro kultivierten Embryoachsen nicht anregen. Auch die weitere Kultivierung solcher blattentfalteten Embryoachsen auf verschiedenen zusammengesetzten Agarnährmedien bzw. in Einheitserde förderte die Wurzelbildung nicht.

5. Äthanolextrakt aus 15 Wochen stratifizierten Kirschembryonen fördert das Sproß- und Wurzelwachstum in-vitro kultivierter Embryoachsen ruhender ausgereifter, sowie ausgewachsener unreifer Embryonen und die jungen unreifen Embryonen. Wachstumsabnormalität konnte in der späteren Sämlingsentwicklung nicht beobachtet werden.

6. Der oben erwähnte Extrakt scheint hitzelabil zu sein, da seine günstige Wirkung zum größten Teil durch Autoklavieren zerstört wird. Die günstigste Konzentration des zugegebenen Extraktes entspricht 1 nachgereiftem Embryo, eine Konzentration entsprechend 2 Embryonen, hemmt vor allem das Sproßwachstum. Entspricht die zugegebene Extraktmenge 3 Embryonen, so wurden Sproß- und Wurzelbildung weitgehend inhibiert.

7. Geschrumpfte Embryonen können nicht in-vitro-Kulturen wachsen. Embryoachsen aus geschrumpften Embryonen entwickeln sich jedoch ähnlich wie solche aus normal ausgebildeten Embryonen. Dieses beruht auf der Tatsache, daß bei geschrumpften Embryonen der Schrumpfungsprozeß bei den Kotyledonen beginnt und erst später auf die Embryoachse (meristematische Gewebe) übergreift.

8. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Näheres über die Aufklärung des Komplexes der embryonalen Dormanz sowie den Nachreifeprozess zu erfahren. Dazu sollen Extrakte aus Kirschembryonen gewonnen, fraktioniert und die verschiedenen Fraktionen biologisch mit Hilfe der hier in der vorliegenden Arbeit entwickelten "Embryoachsen-Test" geprüft werden. Es empfiehlt sich weiter für Proembryonen geeignete Kulturmethoden zu entwickeln. Für Sämlinge aus Embryokultur sind weitere Maßnahmen zur Verbesserung ihres Wachstums in-vivo erforderlich.

10. Literaturverzeichnis

- AMEN, R.D.: A model of seed dormancy.
Bot. Rev. (N.Y.) 34: 1-31, (1968)
- BAIN, J.M. and F.V. MERCER: Subcellular organization of the developing of *Pisum sativum* L.
Aust. J. biol. Sci. 19: 49-67, (1966a)
- BAIN, J.M. and F.V. MERCER: Subcellular organization of the cotyledons in germinating seeds and seedlings of *Pisum sativum* L.
Aust. J. biol. Sci. 19: 69-84, (1966b)
- BAIN, J.M. and F.V. MERCER: The relationship of the axis and the cotyledons in germinating seeds and seedlings of *Pisum sativum* L.
Aust. J. biol. Sci. 19: 85-96, (1966c)
- BALL, E.: Growth of the embryo of *Gingo biloba* under experimental conditions. III. Growth rates of root and shoot upon media absorbed through the cotyledons.
Amer. J. Bot., 46: 130-39, (1959)
- BARTON, L.V.: Biochemical studies of dormancy and after-ripening of seeds. II. Changes in oligobasic organic acids and carbohydrates.
Contr. Boyce Thompson Inst. 21: 147-61, (1961)
- BARTON, L.V. and J.L. BRAY: Biochemical studies of dormancy and after-ripening of seeds. III. Nitrogen metabolism.
Contr. Boyce Thompson Inst. 21: 465-72, (1962)
- BARTON, L.V. and J.L. BRAY: Biochemical studies of dormancy and after-ripening of seeds. IV. Further studies on changes in contents of some amino acids and organic acids.
Contr. Boyce Thompson Inst. 23: 311-18, (1967)
- BERLYN, G.P. and J.P. MIKSCHKE: Growth of excised pine embryos and the role of cotyledons during germination in vitro.
Amer. J. Bot. 52: 730-36, (1965)
- BLAKE, M.A.: Growth of the fruit of the Elberta peach from blossom bud to maturity.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 22: 29-38, (1925)
- BLAKE, M.A.: Some results of crosses of early ripening varieties of peaches.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 37: 232-41, (1939)
- BRAAK, J.P.: Effect of some internal and external factors of the embryo and seedling development of the cherry.
Inst. Veredel. Tuibouwgew. Meded. 99:, (1957)
- BRAAK, J.P.: Influence of growth condition on fruit and embryo development in apple and cherry.
Inst. Veredel. Tuibouwgew. Meded. 182: 57-65, (1962)

- BRADBURY, D.: A comparative study of the developing and aborting fruit of *Prunus cerasus*. Amer. J. Bot. 16: 525-42, (1929)
- BRADLEY, M.V. and J.C. CRANE: Effect of auxins on development of apricot seeds and seedlings. Amer. J. Bot. 44: 164-75, (1957)
- BRINGEZU, A.: Untersuchungen über die Samenausbildung von Sauerkirscharten. Arch. Gartenb. 15: 149-60, (1967)
- BROOKS, H.J. and L.F. HOUGH: Vernalization studies with peach embryos. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 71: 95-102, (1958)
- BROWN, C.L. and E.M. GIFFORD: The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown in vitro. Plant Physiol. 33: 57-64, (1958)
- CAPLIN, S.M. and F.C. STEWARD: A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic condition. Nature 163: 920-21, (1949)
- CARLSON, R.F.: Peach seed germination and seedling growth as influenced by several factors. Quarterly Bull. Michigan Agr. Exp. Sta. 49: 276-82, (1967)
- CHAILAKHIAN, M.KH. and V.Z. PODOLNY: Role of cotyledons in the juvenile period of plant development. Fiziol. Rastenij 15: 949-57, (1968)
- CHAO, L. and D.R. WALKER: Effects of a magnetic field on the germination of apple, apricot and peach seeds. Hort. Science 2: 152-53, (1967)
- CHOUDHURY, B.: Embryo culture technique. I. The growth of immature tomato embryos in vitro. Indian Jour. Agr. 12: 143-51, (1955)
- COME, D.: L'inhibition de germination des graines de pommier (*Pirus malus* L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires. Ann. Sci. Natur. Bot. (Paris), Sér. 12: 8, 371-478, (1967)
- COME, D. et C. THÉVENOT: Influence de l'excision d'un cotylédon sur la germination des embryons de pommier (*Pirus malus* L. dormants). C.R. Acad. Sci. Sér. D. 267: 1832-34, (1968)
- CONNORS, C.H.: Growth of fruits of the peach. New Jersey Agr. Exp. St. Ann. Rep. 41: 82-89, (1919)
- CRANE, M.B. and A.G. BROWN: Incompatibility and sterility in the sweet cherry (*Prunus avium* L.). Jour. Pom. Hort. Sci. 15: 86-116, (1937)

- CRANE, J.C. and P. PUNSRI: Comparative growth of the endosperm and the embryo in unsprayed and 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid sprayed Royal and Tilton apricots. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 68: 96-104, (1956)
- CROCKER, W. and L.V. BARTON: After-ripening, germination and storage of certain rosaceous seeds. Contr. Boyce Thompson Inst. 3: 385-404, (1931)
- CROCKER, W. and L.V. BARTON: Physiology of seeds. An introduction to the experimental study of seed and germination problem. Chronica Botanica XV, (1953)
- DANIELSSON, B.: The embryo culture of stone fruit. Sver. pomol. Fören. Arsskr., 51: 200-6, (1950)
- DAVIDSON, O.W.: The germination of "non-viable" peach seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30: 129-32, (1933)
- DAVIDSON, O.W.: Growing trees from "non-viable" peach seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 32: 308-12, (1935)
- DIETERICH, K.: Über die Kultur von Embryonen außerhalb des Samens. Flora 117: 379-417, (1924)
- DRESSLER, I.: Die Desinfektion und Aussaat von Orchideensamen unter UV-Licht. Orchidee 6: 21-26, (1955)
- DULIEU, H.L.: Pollination of excised ovaries and culture of Nicotiana tabacum. Phytomorphology 16: 69-75, (1966)
- FINE, J.M. and L.V. BARTON: Biochemical studies of dormancy and after-ripening in seeds. I. Changes in free amino acid content. Contr. Boyce Thompson Inst. 19: 483-500, (1958)
- FLEMION, F.: Dwarf seedlings from non after-ripened embryos of peach, apple and hawthorn. Contr. Boyce Thompson Inst. 6: 205-9, (1934)
- FLEMION, F.: A rapid method for determining the germination power of peach seeds. Contr. Boyce Thompson Inst. 8: 289-93, (1936)
- FLEMION, F. and E. WATERBURY: Further studies with seedlings of non-after-ripened peach seeds. Contr. Boyce Thompson Inst. 13: 415-22, (1945)
- FLEMION, F.: Effects of temperature, light and nutrients on physiological dwarfing in peach seedlings. Plant Physiol. 31: (Suppl.) iii, (1956)
- FLEMION, F.: Effect of temperature, light and gibberellic acid on stem elongation and leaf development in physiologically dwarfed seedlings of peach and Rhodotypos. Contr. Boyce Thompson Inst. 20: 57-70, (1959)

- FLEMION, F. and D.S. de SILVA: Bioassay and biochemical studies of extracts of peach seeds in various stages of dormancy. Contr. Boyce Thompson Inst. 20: 365-79, (1960)
- FLEMION, F. and P.L. PROBER: Production of peach seedlings from unchilled seeds. I. Effect of nutrients in the absence of cotyledonary tissue. Contr. Boyce Thompson Inst. 20: 409-19, (1960)
- FLEMION, F. and C. TOPPING: Cytochemical studies of the shoot apices of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. I. Cell wall components. Contr. Boyce Thompson Inst. 21: 233-45, (1961)
- FLEMION, F.: Cytochemical studies of the developing primary cell wall in the apical shoot of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. Plant Physiol. 36: (Suppl.) XXNII, (1961)
- FLEMION, F. and C. TOPPING: Cytochemical studies of the shoot apices of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. II. Starch distribution. Contr. Boyce Thompson Inst. 22: 17-22, (1963)
- FLEMION, F. and J. BEARDOW: Histological studies of physiologically dwarfed peach seedlings. I. Structure of anomalous leaves. Contr. Boyce Thompson Inst. 22: 117-31, (1963)
- FLEMION, F. and J. BEARDOW: Histological studies of physiologically dwarfed peach seedlings. II. Structure of anomalous areas in the shoot tip. Contr. Boyce Thompson Inst. 22: 413, 23, (1964a)
- FLEMION, F. and J. BEARDOW: Physiologically dwarfed seedlings of flory dwarf peach. Contr. Boyce Thompson Inst. 22: 503-5, (1964b)
- FLEMION, F. and J. BEARDOW: Production of peach seedlings from non-chilled seeds. II. Effect of subsequent cold periods on growth. Contr. Boyce Thompson Inst. 23: 101-7, (1965)
- FLEMION, F., R.E. DENGLER, N.G. DENGLER and K.D. STEWART: Ultrastructure of the shoot apices and leaves of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. I. Plastid development. Contr. Boyce Thompson Inst. 23: 331-44, (1967)
- FOGLE, H.W.: Effects of duration of after-ripening, gibberellin and other pretreatments on sweet cherry germination and seedling growth. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 72: 129-33, (1958)
- FOGLE, H.W. and C.S. McCORRY: Effects of cracking, after-ripening and gibberellin on germination of Lambert cherry seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 76: 134-38, (1960)
- FRANKLAND, B.: Effect of gibberellic acid, kinetin and other substances on seed dormancy.

- FRANKLAND, B. and P.F. WAREING: Changes in endogenous gibberellins in relation to chilling of dormant seeds. Nature 194: 313-14, (1962)
- GARNER, R.J.: Einige Probleme bei der Anzucht niedriger Baumformen bei Süßkirschen. Der Erwerbsobstbau, Heft 10, (1968)
- GAUTHERET, R.J.: La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson et Cie., Paris (1959)
- GILMORE, A.E.: A technique for embryo culture of peaches. Hilgardia 20: 147-70, (1950)
- GORTER, J.C.: In vitro culture of cyclamen embryos. Proc. Kon. nederl. Akkad. Wetensch 58: 377-385, (1955)
- GRUPPE, W. Das Institut für Obstbau der Justus Liebig Universität Gießen. Der Erwerbsobstbau 11: 14-16, (1969)
- de HAAS, P.G. und H. SCHANDER: Keimungsphysiologische Studien an Kernobst. I. Samen und Keimung. Z. Pflanzenzüchtg. 31: 457-512, (1952)
- HALL, C.B.: Culture of Solanum nigrum embryos. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 52:343-46, (1948)
- HANNIG, E.: Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen außerhalb des Embryosackes. Bot. Ztg. 62: 45-80, (1904)
- HAUT, I.C.: The effect of various low temperatures upon the after-ripening of fruit tree seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30:365-67, (1934)
- HEINICKE, A.J.: Factors influencing the abscission of flowers and partially developed fruit of the apple (Pyrus Malus L.). New York Agric. Exp. St. Bull. 393: (1917)
- HESSE, C.O. and D.E. KESTER: Germination of embryos of Prunus related to degree of embryo development and method of handling. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 65:251-64, (1955)
- HILDEBRANDT, W.: Keimungsphysiologische Studien an Steinobst. I. Die Ursachen der Keimruhe von Steinobstsaatgut. Gtb. Wiss. 24, Heft 2: 161-76, (1959)
- HILDEBRANDT, W.: Keimungsphysiologische Studien an Steinobst. III. Die Feuchtigkeitsaufnahme des Steinobstsaatgut bei der Quellung und der Einfluß der Feuchtigkeit auf die Keimung. Gtb. Wiss. Heft 1/2 : 15-31, (1960 a)

- HILDEBRANDT, W.: Keimungsphysiologische Studien an Steinobst. IV! Untersuchungen zur Ermittlung der Mindeststratifikationsdauer bei verschiedenen Steinobstarten. 6, Gtb. Wiss. Heft 3/4: 162-73, (1960 b)
- HILKENBÄUMER, F.: Versuche zur Behebung des Keimverzuges bei Steinobstsamen und zur Klärung seiner Ursache. Landw. Jahrb. 82: 883-924, (1936)
- HOTTA, Y.: Roles of the cotyledons in the morphological differentiation of bean seedling. Bot. Mag. Tokyo 70: 383-90, (1957)
- INOMATA, N.: In vitro culture of ovaries of Brassica hybrids between 2x and 4x. I. Culture medium. Jap. J. Breed. 18: 139-48, (1968)
- JOHRI, B.M. and Y. P. SINGH BAJAJ: Growth responses of globular proembryos of *Dendrophthoe falcata* (L.F.) Ettingsh. in culture. Phytomorphology 15: 292-300, (1965)
- JOLEY, L.E.: Effect of warm followed by cold stratification on germination of *Prunus avium* seed. The plant propagator 13 (4): 10-14, (1967)
- KEIM, W.F.: An embryo culture technique for forage legumes. Agron. J. 45: 509-10, (1953)
- KESTER, D.E.: Factors affecting the aseptic culture of Lovell peach seedlings. Hilgardia 22: 335-65, (1953)
- KESTER, D.E. and C.O. HESSE: Embryo culture of peach varieties in relation to season of ripening. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 65: 265-73, (1955)
- KLASSEN, A.J. and E.N. LARTER: In vitro culture of ovaries produced from a barley-ryecross. Canad. J. Genetics Cytol. 9: 404-7, (1967)
- KOBEL, F.: Lehrbuch des Obstbaues auf physiologischer Grundlage. 2. Auflage, (1954)
- KRAMER, S.: Beiträge zur Züchtungsforschung beim Pfirsich. I. Untersuchungen zur Frucht- und Embryonalentwicklung bei Pfirsichsorten (*Prunus persica* L.) Arch. Gartenb., 4: 67-82, (1956)
- KRAPF, B. und R. THEILER: Beitrag zur Züchtung neuer Kirscharten. Schweiz. Z. Obst- u. Weinb. 26: 665-70, (1968)
- KÜPPERS, H.: Eine neue beachtenswerte Unterlage. Deutsche Baumschule. 15: 1-4, (1963)
- KÜPPERS, H.: Eine wertvolle Vogelkirsche aus sortenreiner Saat. Deutsche Baumschule. 16: 34-36, (1964)

- KRUEGER, W.E.: Principles of Microbiology.
W.B. Saunders Company, Philadelphia and
London (1953)
- LA CROIX, L.J.
and A.S. JASWAL: Metabolic changes in after-ripening seed
of *Prunus cerasus*.
Plant. Physiol. 42: 479-80, (1967)
- LAIBACH, F.: Das Taubwerden von Bastardsamen und die
künstliche Aufzucht früh absterbender
Bastardembryonen.
Z. Bot. 17: 417-59, (1925)
- LAIHACH, F.: Kreuzungsschwierigkeiten bei Pflanzen und
die Möglichkeit ihrer Behebung.
Ber. dtsoh. bot. Ges. 48: 58-77, (1930)
- LAMMERTS, W.E.: Embryo culture an effective technique for
shortening the breeding cycle of deciduous
trees and increasing germination of hybrid
seed.
Amer. J. Bot. 29: 166-71, (1942)
- LAMMERTS, W.E.: Effect of photoperiod and temperature on
growth of embryo-cultured peach seedlings.
Amer. J. Bot. 30: 707-711, (1943)
- LA RUE, C.D.: The use of bromine in the sterilization of
fruits and seeds.
Science 85: 319, (1937)
- LEDBETTER, M.C.: Anatomical and morphological comparison of
normal and physiologically dwarfed
seedlings of *Rhodotypos tetrapetala* and
Prunus persica.
Contr. Boyce Thompson Inst. 20: 437-58,
(1960)
- LESLEY, J.W. and The development of normal peach seedlings
J. BONNER from seeds of early-maturing varieties.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 60: 238-42,
(1952)
- LILLELAND, O.: Growth study of the apricot fruit.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 28: 237-45,
(1931)
- LILLELAND, O.: Growth study of the peach fruit.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 29: 8-12, (1932)
- LILLELAND, O.: Growth study of the plum fruit. I. The
growth and changes in chemical composition
of the Climax plum.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30: 203-08,
(1933)
- LILLELAND, O.: Growth study of the apricot fruit. II. The
effect of temperature.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 33: 269-79,
(1935)
- LILLELAND, O. A growth study of the cherry fruit.
and L. NEWSAME: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 32: 291-99,
(1934)

- LILLELAND, O. and L. NEWSAME: A growth study of the cherry fruit. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 32: 291-99, (1934)
- LINDENBEIN, W.: Beiträge zur Kenntnis der Samen und Früchte. VI. Die im Samenhandel befindlichen Steinkerne der Gattung *Prunus* L. Sektion *Euprunus* Koehne. Saatgutwirtschaft 15: 357-61, (1963)
- LOFLAND, H.B.: In vitro culture of the cotton embryos. Bot. Gaz. 111: 307-11, (1950)
- LUCKWILL, L.C.: The hormone content of the seed in relation to endosperm development and fruit drop in the apple. Jour. Hort. Sci. 24: 32-44, (1948)
- LUCKWILL, L.C.: Growth-inhibiting and growth-promoting substances in relation to the dormancy and after-ripening of apple seeds. Jour. Hort. Sci. 27: 53-67, (1952)
- LUCKWILL, L.C.: Hormone production by the developing apple seed in relation to fruit drop. Jour. Hort. Sci. 28: 14-24, (1953)
- LUCKWILL, L.C., P. WEAVER and J. MACMILLAN: Gibberellins and other growth hormones in apple seeds. Jour. Hort. Sci. 44: 413-24, (1969)
- LUTKOVA, I.N. and P.M. OLESHKO: Effect of an electric current during stratification in cherry seeds. Fiziol. Rastenij 12: 238-41, (1965)
- MAHESHWARI, N.: In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. Science 127: 342, (1958)
- MALPIGHI, M.: Anatomie plantarum. Londoni (1675). Deutsche Ausg. v. Möbius, Leipzig (1901)
- MATSUBARA, S.: Studies on the growth-promoting substance "embryo factor" necessary for the culture of young embryos of *Datura tatula* in vitro. Bot. Mag. Tokyo 75: 10-18, (1962)
- MATSUBARA, S.: Effect of Lupinus growth factor on the in vitro growth of embryos of various plants and carrot root tissue. Bot. Mag. Tokyo 77: 403-11, (1964)
- MAURER, K.J.: Die Befruchtungsverhältnisse bei Süß- und Sauerkirschen. Obstbau und Garten 6: 224-25, (1969)
- MER, C.L.: What is an inhibitor? Z. Pflanzenphysiol. 59: 415-19, (1968)
- MES, M.G.: Gibberellic acid and the chilling requirements of peach seeds. Nature 184: 2034-35, (1959)

- MIETTINEN, J.K. A chemical study of the neomorphosis induced by glycine in *Oenanthë aquatica*. *Physiologia Pl.* 11: 193, (1958)
- MIMAUULT, J.: Auxines et inhibiteurs de croissance des graines de cerisier (variété "Bigarreau Napoléon"). *Rev. gén. Bot.* 64: 25-33, (1957)
- MONET, R.: Méthode permettant l'obtention de plantes viables à partir d'embryons de variétés très précoces chez le pêcher. *Ann. Amélior. Plantes* 18: (I), 85-91, (1968)
- MOTHES, K., L. ENGELBRECHT and O. KULAJEWA: Über die Wirkung des Kinetins auf Stickstoffverteilung und Eiweißsynthese in isolierten Blättern. *Flora* 147: 345-64, (1959)
- MÜLLER-THURGAU, H.: Die Abhängigkeit der Ausbildung der Traubenbeeren und einiger anderer Früchte von der Entwicklung der Samen. *Landw. Jb. Schweiz* 12: 135-205, (1898)
- MÜLLER, K. und A.C. LEOPOLD: The mechanism of Kinetin-induced transport in corn leaves. *Planta (Berl.)* 68: 186-205, (1966)
- MÜNTZING, A.: Über Chromosomenvermehrung in Galeopsis-Kreuzungen und ihre phylogenetische Bedeutung. *Hereditas* 14: 153-72, (1930/31)
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97, (1962)
- MURAWSKI, H. und J. ENDLICH: Beiträge zur Züchtungsforschung an Kirschen. II. Befruchtungsbiologische und embryologische Untersuchungen an der Sauerkirschsorte Köröser Weichsel. *Arch. Gartenb.* 10: 616-46, (1962)
- NARAYANASWAMI, S. and K. NORSTOG: Plant embryo culture. *Bot. Rev. (N.Y.)* 30: 587-628, (1964)
- NEUMANN, K.H.: Wurzelbildung und Nukleinsäuregehalt bei Phloemgewebekulturen der Karottenwurzel auf synthetischen Nährmedien verschiedener Hormonkombinationen. *Les Phytohormones et l'organogenèse*. Congr. intern. Uni. de Liège, (1965)
- NEUMANN, K.H.: Die Abhängigkeit der hormonal gesteuerten Zellteilungsaktivität bei Gewebekulturen vom Nährstoffverhältnis. *Landw. Forschung* 23 (1. Sonderheft): 61-69, (1969 b)
- NEUMANN, M.: Methoden und Bedeutung der pflanzlichen Embryokultur. *Biol. Zbl.* 88: 595-609, (1969 a)

- NITSCH, J.P.: Growth and development in vitro excised ovaries.
Amer. J. Bot. 38: 566-77, (1951)
- OLNEY, H.O. and B.M. POLLOCK: Studies of rest period. II. Nitrogen and Phosphorus changes in embryonic organs of after-ripening cherry seed.
Plant Physiol. 35: 970-75, (1960)
- van OVERBEEK, J. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young "Datura" embryos.
M.E. CONKLIN and A.F. BLAKESLEE: Science 94: 350-51, (1941)
- van OVERBEEK, J. Factors affecting the growth of Datura R. SIU and A.J. embryos in vitro.
HAAGEN-SMIT: Amer. J. Bot. 31: 219-24, (1944)
- PARIS, D., J. RIETSEMA, S. SATINA and A.F. BLAKESLEE: Effect of amino acids, especially aspartic and glutamic acids and their amides, on the growth of Datura stramonium embryos in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. 39: 1205-12, (1953)
- PASSECKER, F.: Keimphysiologische Untersuchungen an Kern- und Steinobst.
Gtb. Wiss. 2: 274-90, (1955)
- PÉCHOUTRE, F.: Contribution à l'étude du développement de l'ovule et de la graine des Rosacées.
Ann. Sci. Nat. Bot. (Sér. 8) 16: 1-158, (1902)
- PIENIAZEK, J. and M.J. GROCHOWSKA: The role of the natural growth inhibitor (Abscisin II) in apple seed germination and the changes in the content of phenolic substances during stratification.
Acta. Soc. bot. pol. 36: 579-87, (1967)
- PILLAY, D.T.N., K.D. BRASE and L.J. EDGERTON: Effects of pre-treatments, temperature and duration of after-ripening on germination of Mazzard and Mahaleb cherry seeds.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86: 102-07, (1965)
- PILLAY, D.T.N. and L.J. EDGERTON: Relationship of growth substances to rest period and germination in Mazzard cherry seeds.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86: 108-14, (1965)
- POLLOCK, B.M. and H.O. OLNEY: Studies of the rest period. I. Growth, translocation, and respiratory changes in the embryonic organs of the after-ripening seed.
Plant Physiol. 34: 131-42, (1959)
- POLLOCK, B.M.: Temperature control of physiological dwarfing in peach seedlings.
Nature 183: 1687-88, (1959)

- POLLOCK, B.M.: Temperature control of physiological dwarfing in peach seedlings.
Plant Physiol. 37: 190-97, (1962)
- POSTSOV, A.V.: Biological significance of the dormancy stage (delayed germination) of seeds.
Zh. obšč. Biol. 27: 544-54, (1966)
- PROCTOR, J.T.A. and F.G. DENNIS: Gibberellin-like substances in after-ripening seeds of *Prunus avium* L. and their possible role in dormancy.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 93: 110-14, (1968)
- RAGHAVAN, V. and J.G. TORREY: Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture.
Amer. J. Bot. 50: 540-51, (1963)
- RAGHAVAN, V.: Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos.
Biol. Rev. 41: 1-58, (1966)
- RANDOLPH, L.F. and L.G. COX: Factors influencing the germination of *Iris* seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 43: 284-300, (1943)
- RANDOLPH, L.F.: Embryo culture of *Iris* seed.
Bull. Amer. Iris Soc. 97: 33-45, (1945)
- REMY, P.: Le rôle du tégument des graines d'arbres fruitiers dans leur germination (genre *Prunus*).
Ann. Inst. Nat. Rech. agronom., Sér. B, 2: 347-49, (1952)
- REMY, P.: L'évolution des substances de croissance pendant la germination sur milieu artificiel d'amandes d'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) non exposées au froid.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 244: 1666-69, (1957)
- RIETSEMA, J., S. SATINA and A.F. BLAKESLEE: The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos in vitro.
Amer. J. Bot. 40: 538-45, (1953)
- RIJVEN, A.H.G.C. In vitro studies on the embryo of *Capsella bursa-pastoris*.
Acta. Bot. Neerl. 1: 157-200, (1952)
- RÜHLE, K.: Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Prunus*.
Bot. Arch. 8: 224-49, (1924)
- SANDERS, M.E. and N.K. ZIEBUR: Artificial culture of embryos. In: recent advances in the embryology of angiosperms.
Ed. P. Maheshwari, Intern. Soc. Plant Morphologιστα, Delhi: 297-325, (1963)

- SARFATTI, G.: Accrescimento del pericarpo, seme, endosperma ed embrione in *Prunus Amygdalus* Stokes.
Nuovo G. bot. ital. N.S. 68: 118-35, (1961)
- SASAKI, S. and T.T. KOZLOWSKI: The role of cotyledons in early development of pine seedlings.
Canad. J. Bot. 46: 1173-83, (1968)
- SCHANDER, H.: Keimphysiologische Studien an Kernobst. III. Sortenvergleichende Untersuchungen über die Temperaturansprüche stratifizierten Saatgutes von Kernobst und über die Reversibilität der Stratifikationsvorgänge.
Z. Pflanzenzüchtg. 35: 89-97, (1955a)
- SCHANDER, H.: Keimphysiologische Studien an Kernobst. IV. Untersuchungen über Sortenunterschiede hinsichtlich der Temperaturansprüche und der Frostresistenz während der Keimung sowie über Alterserscheinungen bei Samen von Kernobst.
Z. Pflanzenzüchtg. 35: 179-98, (1955b)
- SCHANDER, H.: Keimphysiologische Studien über Kernobst. V. Sortenvergleichende Untersuchungen über Einflüsse von Wärme- und Kältebehandlungen, die vor der Stratifizierung auf den Samen einwirkten.
Z. Pflanzenzüchtg. 35: 345-61, (1956a)
- SCHANDER, H.: Über die Ursache von Gewichtsunterschieden bei Samen von Kernobst (Apfel und Birne). II. Der Einfluß verschiedener Erb- und Umweltfaktoren auf die Beziehung zwischen Samen und Frucht (Beiträge zur Physiologie der Fruchtentwicklung).
Z. Pflanzenzüchtg. 36: 31-80, (1956b)
- SCHANDERL, H.: Die Entwicklungsgeschichte des Embryos bei den Rosaceengattungen *Prunus*, *Pirus* und *Malus*.
Der Züchter 19: 206-10, (1949)
- SCHMIDT, H.: Unterlagenprobleme bei Kirschen. Wege zur Schaffung kleinkroniger Kirschbäume.
(im Druck 1970)
- SKIEBE, K.: Über die genetischen Ursachen der Samenbildung.
Der Züchter 37: 75-82, (1967)
- SKIRM, G.W.: Embryo culturing as an aid to plant breeding.
Jour. Hered. 33: 211-15, (1942)
- SMITH, C.W.: A study of the growth of excised embryo shoot apices of wheat in vitro.
Ann. Bot. N.S. 31: 593-605, (1967)

- STERLING, C.: Development anatomy of the fruit *Prunus domestica* L.
Bull. Torrey Bot. Club, 80: 457-77, (1953)
- STEWART, F.C., S.M. CAPLIN and F.K. MILLAR: Investigation in growth and metabolism of plant cells. I. New techniques for the investigation of metabolism nutrition and growth in undifferentiated cells.
Ann. Bot. N.S. 16: 57-77, (1952)
- STINGL, G.: Experimentelle Studie über die Ernährung von pflanzlichen Embryonen.
Flora 97: 308-31, (1907)
- STÖSSER, R.: Befruchtungsbiologische und embryologische Untersuchungen bei der Süßkirsche (*Prunus avium*).
Diss. Hohenheim, (1966)
- STÖSSER, R. und J. NEUEHLLER: Untersuchungen über die Mobilisierung von Reservesubstanzen in abortierenden Kirschen-embryonen während der Entwicklung der Frucht am Baum.
Angew. Bot. 41: 109-26, (1967)
- STÖSSER, R.: Die Fruchtentwicklung bei Kirschen unter dem Einfluß unterschiedlicher Witterungsbedingungen.
Der Erwerbsobstbau 8: 150-51, (1968)
- STOKES, P.: A new technique for the sterile culture of plant embryos in vitro.
Nature 170: 242, (1952a)
- SUSZKA, B.: Influence of temperature factor on the breaking of dormancy in Mazzard seeds (*Prunus avium* L.).
Summary from Arboretum Korn. Roc. VII: 189-268, (1962)
- SUSZKA, B.: Studies on dormancy and germination of seeds from various species of the genus *Prunus* L.
Summary from Arboretum Korn. Roc. XII: 278-80, (1967)
- TANNER, F.: Anwendung und Projektierung von Ultraviolett-Bestrahlungsanlagen in der Industrie.
Elektropost 114-17, (1953)
- TAYLOR, J.W.: Growth of non-stratified peach embryos.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 69: 148-51, (1957)
- THEOBALD, W.L. and F.L. HOUGH: The relationship between stage of peach embryo development and seedling growth and survival.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75: 163-70 (1960)
- TILLSON, H.: Blossom bud differentiation and embryo development in *Prunus mahaleb*.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 50: 219-23, (1947)

- TUKEY, H. B.: Growth of the peach embryo in relation to growth of fruit and season of ripening. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30: 209-218, (1933a)
- TUKEY, H. B.: Embryo abortion in early ripening varieties of *Prunus avium*. Bot. Gaz., 94: 433-68, (1933b)
- TUKEY, H. B.: Artificial culture of sweet cherry embryos. Jour. Hered., 24: 7-12, (1933c)
- TUKEY, H. B.: Growth of the embryo, seed and pericarp of the sour cherry (*Prunus cerasus*), in relation to season of fruit ripening. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 31: 125-44, (1934a)
- TUKEY, H. B.: A normalous embryo of cultivated varieties of *Prunus* with particoular reference to fruit breeding. Bot. Gaz., 95: 493-7, (1934b)
- TUKEY, H. B.: Artificial culture methodes for isolated embryos of deciduous fruits. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 32: 313-22, (1935)
- TUKEY, H. B.: Development of cherry and peach fruits as affected by destruction of the embryo. Bot. Gaz., 98: 1-24, (1936)
- TUKEY, H. B. and F. A. LEE: Embryo abortion in the peach in relation to chemical composition and season of fruit ripening. Bot. Gaz., 98: 586-97 (1937)
- TUKEY, H. B.: Growth patterns of plants developed from immature embryos in artificial culture. Bot. Gaz., 99: 630-65, (1938)
- TUKEY, H. B. and J. O. YOUNG: Histological study of the developing fruit of the sour cherry. Bot. Gaz., 100: 723-49, (1939)
- TUKEY, H. B.: Time interval between full bloom and fruit maturity for several varieties of apples, peaches, pears and cherries. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 40: 133-40, (1940)
- TUKEY, L. D.: Effect of night temperature on growth of the fruit of the sour cherry. Bot. Gaz., 114: 155-65, (1952)
- von VEEN, H.: The effect of various growth-regulators on embryos of *Capsella bursa-pastoris* growing in vitro. Acta. Bot. Neerl., 12: 129-71, (1963)
- von VEH, R.: Eine neue Methode der Anzucht von Sämlingen unabhängig von Ruheperiode und Jahreszeit. Der Züchter, 8: 145-51, (1936a)

- von VEH, R.: Die Anzucht von Kirschsämlingen aus frischgeerntetem Saatgut.
Der Züchter, 12: 305-12, (1936b)
- von VEH, R.: Entwicklung und Stimulation.
Der Züchter, 11: 288-98, (1937)
- VISSER, T.: After-ripening and germination of apple seeds in relation to the seed-coats.
Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C, 57: 175-85, (1954)
- VISSER, T.: The role of seed coats and temperature in after-ripening, germination and respiration of apple seeds.
Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C, 59: 211-22, (1956a)
- VISSER, T.: Some observations on respiration and secondary dormancy in apple seeds.
Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C, 59: 314-24, (1956b)
- WALLHAUSER, K. H. Sterilisierung- Desinfektion- Konservierungs- und H. SCHMIDT: Chemotherapie.
Georg Thieme Verl., Stuttgart (1967)
- WANG, D. and J. BEARDOW: Thermo-photo-effect on rosaceous seeds during germination as expressed in subsequent development.
Cotr. Boyce Thompson Inst. 24: 17-23, (1968)
- von WANGENHELM, K.H.: Zur Ursache der Abortion von Samenanlagen in Diploid-Polyploid-Kreuzungen.
I. Die Chromosomenzahl von mütterlichem Gewebe, Endosperm und Embryo.
Z. Pflanzenzüchtung. 46: 13-19, (1961)
- von WANGENHELM, K.H.: Zur Ursache der Abortion von Samenanlagen in Diploid-Polyploid-Kreuzungen.
II. Unterschiedliche Differenzierung von Endospermen mit gleichem Genom.
Z. Vererbungsl. 93: 319-34 (1962)
- WAREING, P.F.: Endogenous inhibitors in seed germination and dormancy.
Enoyl. Plant Physiol. 15: 909-24, (1965)
- WAREING, P.F.: Germination and dormancy
The physiol. of plant growth and development
Ed. M.B. Wilkins, McGraw-Hill, London (1969)
- WATKINS, A.E.: Hybrid sterility and incompatibility.
J. Genetics 25: 125-62, (1932)

- WERCKMEISTER, P.: Über die künstliche Anzucht von Iris-Bastardsamen.
Gtb. Wiss. 8: 607-8, (1934)
- WERCKMEISTER, P.: Über Herstellung und künstliche Anzucht von Bastarden der Gattung Iris.
Gtb. Wiss. 10: 500-20, (1936)
- WHITE, P. R.: A handbook of plant tissue culture. (1943)
- WILLING, H.: Phänologische und ohemische Untersuchungen zur Fruchtentwicklung bei Kirschen.
Arch. Gartenb. 8: 561-94, (1960)
- WILSON, J. K.: Calcium hypochlorite as a seed sterilizer.
Amer. J. Bot. 2: 420-27, (1915)
- ZAGAJA, S.W.: Some physiological and embryological aspects of immature peach embryos.
Doctor's Thesis. Rutgers, The State Univ. New Brunswick, N.J. (1959)
- ZAGAJA, S.W., L.F. HOUGH and C.H. BALLEY: The responses of immature peach embryo to low temperature treatments.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75: 171-80, (1960)
- ZAGAJA, S.W. and L.F. HOUGH: Survey of amino-acids in acid hydrolysates from embryos of early and late ripening peaches.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75: 181-7, (1960)
- ZAGAJA, S. W.: Preliminary results of investigations on the effect of low temperatures on the development of seedlings from immature embryos of sweet and sour cherries.
Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. biol. 9: 113-15, (1961a)
- ZAGAJA, S.W.: The effect of embryo stratification on the subsequent growth of cherry (*Prunus avium*) seedlings.
Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. biol. 9: 267-69, (1961b)
- ZAGAJA, S. W.: The effect of gibberellic acid on cherry seedling growth.
Hort. Res., 1: 81-84, (1962a)
- ZAGAJA, S. W.: After-ripening requirements of immature fruit tree embryos.
Hort. Res. 2: 19-34, (1962b)
- ZAGAJA, S.W. and J. CZAPSK: Some effect of low temperature treatments on phosphorus uptake by immature apple embryos.
Hort. Res. 2: 13-18, (1962)
- ZAGAJA, S. W.: Growth of seedlings from immature fruit tree embryos.
Proc. Bal. Fruit breeding Symp.: 181-3, (1964)

- ZDRUTKOVSKAJA, A.I.: Raising seed embryos of early cherry varieties.
Agrobiologija, 1: 177-9, (1951)
- ZDRUTKOVSKAJA, A. I: Increasing the viability of seed embryos of early cherry varieties.
Agrobiologija, 2: 113-15, (1953)
- ZIEBUR, N.K., R.A. The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature Hordeum embryos.
BRINK and L.H. GRAF: Amer. J. Bot. 37: 144-8, (1950)
- ZIEBUR, N.K. and R.A. BRINK: The stimulative effect of Hordeum endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro.
Amer. J. Bot. 38: 253-56, (1951)
- ZIELINSKI, Q.B.: Some factors affecting seed germination in sweet cherries.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 72: 123-28, (1958)

An dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. hort. W. Gruppe, Direktor des Instituts für Obstbau der Justus Liebig-Universität, meinen besonderen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas, die stets wohlwollenden Ratschläge, die gern gegebenen Anregungen und für die verständnisvolle Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Ein Teil der Untersuchungen wurde am Institut für Pflanzenernährung der Justus Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Herrn Priv.-Doz. Dr. K. H. Neumann danke ich herzlich, nicht nur für die vielseitige Unterstützung, sondern auch dafür, daß er mich in zahlreichen Diskussionen mit den chemischen und hormonellen Fragen bei Gewebekulturen vertraut machte.

Weiterhin danke ich allen Angehörigen des Instituts für Obstbau, Insbesondere Fräulein Dr. H. Schmidt für die wertvollen Hinweise und die Bereitstellung von pflanzlichem Material, sowie Herrn Prof. Dr. W. Feucht, dem mein Dank für seine freundliche und anregende Unterstützung gilt.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. W. Schaaf, daß er bereitwillig das Untersuchungsmaterial in Oockstadt zur Verfügung stellte.

Lebenslauf

Am 4. 12. 1940 wurde ich, Abdelmonem Abou Zeid, Sohn des Agrar-Ingenieurs Mohamed Abou Zeid und seiner Ehefrau Fatima Khalil, in El Gharbia (Ägypten) geboren.

Von Oktober 1946 bis Juni 1952 besuchte ich die Volksschule in Alexandrien. Nach dreijährigem Besuch der "Primary School" in El Khanka ging ich von 1956 bis 1959 auf das Mostorod-Gymnasium in Kairo. Von 1959 bis 1963 studierte ich Landwirtschaft am Höheren Landwirtschaftsinstitut von Moshtohor, wo ich gleichzeitig in drei Semestern Unterricht in der Deutschen Sprache absolvierte. In diese Studienzeit fällt ein neunmonatiger Praktikumsaufenthalt in einem landwirtschaftlichen Betrieb in der Bundesrepublik Deutschland. Mit der "B.Sc."-Prüfung schloß ich mein Studium ab. Danach arbeitete ich ein Jahr als Agrar-Ingenieur im Forschungsministerium in Kairo.

Im Juli 1964 begann ich für insgesamt ein Jahr bei den Farbwerken Höchst AG in mikrobiologischen und chemischen Laboratorien meine Kenntnisse zu erweitern.

Im Wintersemester 1965/66 immatrikulierte ich mich an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Nach zwei Semestern legte ich am 31. 10. 1966 meine Diplom-Prüfung mit "sehr gut" ab. Als Doktorand am Institut für Obstbau in Gießen begann ich anschließend mit den Versuchen zu der vorliegenden Dissertation.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449